

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – UFPR  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA

ANNE WEIGERT

EFEITOS DA ISOFORMA RECOMBINANTE DA FOSFOLIPASE-D  
(LiRecDT1) DA ARANHA-MARROM (*LOXOSCELES INTERMEDIA*)  
SOBRE A TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR E A PRODUÇÃO DE  
FORÇA EM MÚSCULOS ESQUELÉTICOS DE CAMUNDONGOS

CURITIBA

2014

ANNE WEIGERT

EFEITOS DA ISOFORMA RECOMBINANTE DA FOSFOLIPASE-D  
(LiRecDT1) DA ARANHA-MARROM (*LOXOSCELES INTERMEDIA*)  
SOBRE A TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR E A PRODUÇÃO DE  
FORÇA EM MÚSCULOS ESQUELÉTICOS DE CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre em  
Fisiologia, curso de Pós-Graduação em  
Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Rosalvo T. H. Fogaça

CURITIBA

2014



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



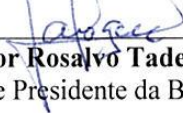
## Ata da defesa de dissertação de mestrado de ANNE WEIGERT

Aos vinte dias do mês de março do ano de dois mil e quatorze, foi realizada no Auditório do Departamento de Fisiologia no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação da mestrand **Anne Weigert**, intitulada **“EFEITOS DA TOXINA (LIRECDT1) DA ARANHA MARROM (LOXOSCELES INTERMEDIA) SOBRE A TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR E A PRODUÇÃO DE FORÇA EM MÚSCULOS ESQUELÉTICOS DE CAMUNDONGOS”**. A abertura teve início às 14h30min pelo Presidente da Banca Examinadora e Orientador da candidata, Professor Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça. O Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou a palavra à aluna, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral, o Professor Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça passou a palavra a primeira examinadora, Professora Doutora Olga Meiri Chaim do Departamento de Biologia Celular da UFPR. Na sequência, passou a palavra ao segundo examinador, Professor Doutor Fernando Augusto Lavezzo Dias do Departamento de Fisiologia da UFPR. A aluna respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, o Presidente, Professor Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela “APROVAÇÃO”, habilitando-a ao título de Mestre em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Rosalvo Tadeu Hochmuller Fogaça, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, a qual assino juntamente com os senhores examinadores.

Curitiba, 20 de março de dois mil e quatorze.

  
**Professora Doutora Olga Meiri Chaim**  
UFPR- Membro Titular

  
**Professor Doutor Fernando Augusto Lavezzo Dias**  
UFPR - Membro Titular

  
**Professor Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller**  
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Centro Politécnico – Caixa Postal 19031 – CEP: 81531-990 – Curitiba/PR  
Telefones: (41) 3361-1714 – Fax (41) 3361-1714 – fisiologia@ufpr.br  
www.bio.ufpr.br



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **ANNE WEIGERT** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à APROVAÇÃO da acadêmica.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 20 de março de 2014.

**Professora Doutora Olga Meiri Chaim**  
UFPR- Membro Titular

**Professor Doutor Fernando Augusto Lavezzo Dias**  
UFPR - Membro Titular

**Professor Doutor Rosalvo Tadeu Hochmuller**  
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rosalvo T. H. Fogaça, pelo tempo que generosa e pacientemente dedicou à orientação desse trabalho, sempre oferecendo os mais valiosos ensinamentos e com a humildade que é típica dos “verdadeiros mestres”.

Aos meus colegas de laboratório, por tornar essa jornada mais suave, mantendo sempre um clima de cordialidade, respeito e alegria em nosso local de trabalho. Obrigado por todas as risadas!!!

Aos funcionários do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, pela atenção e empenho em disponibilizar os animais utilizados nesse trabalho.

A toda a equipe do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos, sob responsabilidade do Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga, por fornecer sempre prontamente a toxina utilizada nesse estudo e todas as informações relacionadas à sua manipulação.

A CAPES pelo apoio financiamento oferecido para a realização do presente estudo.

A toda a minha família (pais, irmão, avó, tios, primos), que além de maravilhosa, calorosa e alegre, é e sempre será meu “porto seguro”.

Ao meu “*marido*” Ricardo D. Torres, que além de grande incentivador é um companheiro maravilhoso, meu grande amigo de todas as horas e responsável por tornar minha vida sempre e a cada dia mais especial.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Aspecto da aranha marrom .....	20
<b>Figura 2:</b> Característica da lesão dermonecrotica da picada da aranha-marrom..	22
<b>Figura 3:</b> Estrutura do sarcômero.....	32
<b>Figura 4:</b> Geometria básica dos filamentos delgados .....	34
<b>Figura 5:</b> Preparação de nervo ciático - músculo gastrocnêmio .....	51
<b>Figura 6:</b> Preparação de músculo gastrocnêmio .....	52
<b>Figura 7:</b> Preparação de músculo solear .....	53
<b>Figura 8:</b> Preparação de músculo diafragma .....	54
<b>Figura 9:</b> Preparação de nervo frênico - músculo diafragma .....	55
<b>Figura 10:</b> Gráficos – Preparação de nervo ciático - músculo gastrocnêmio .....	58
<b>Figura 11:</b> Gráficos – Preparação de nervo frênico – músculo diafragma .....	60
<b>Figura 12:</b> Gráficos – Preparação de músculo gastrocnêmio .....	62
<b>Figura 13:</b> Gráficos – Preparação de músculo solear .....	64
<b>Figura 14:</b> Gráficos – Preparação de músculo diafragma .....	66

## RESUMO

Dentre os componentes do veneno das aranhas *Loxosceles* encontram-se toxinas como as fosfolipases-D, responsáveis por grande parte dos efeitos deletérios do veneno. Essas enzimas catalisam a hidrólise dos fosfolipídios da membrana e os subprodutos gerados desencadeiam uma cascata de eventos celulares cujos efeitos sobre a função muscular esquelética ainda são desconhecidos. Para testar a hipótese central desse estudo, que a isoforma de fosfolipase-D, LiRecDt1, levaria à diminuição da função muscular e/ou comprometeria a transmissão neuromuscular, utilizamos 36 camundongos Swiss, machos, adultos, provenientes e mantidos no Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. Avaliamos, durante 130 minutos, os efeitos diretos da LiRecDt1 ou de PBS (controle) em preparações isoladas e eletricamente estimuladas de nervo frênico-músculo diafragma (100 µg/ml). Os efeitos da prévia inoculação (24 horas) por via intra peritoneal (10µg/kg), com LiRecDt1 ou de PBS (controle) foram avaliados, “*in situ*”, durante 50 minutos, em preparações eletricamente estimuladas de nervo ciático-músculo gastrocnêmio, músculo gastrocnêmio e em preparações isoladas de músculo diafragma e solear (“*in vitro*”). Os parâmetros de contratilidade avaliados foram: valor máximo de produção de força do abalo e as velocidades máximas de contração e de relaxamento. **Resultados:** Durante todo o curso temporal, a exposição direta das preparações à LiRecDt1 ou a sua prévia inoculação não produziu alterações significativas dos parâmetros de contratilidade avaliados. **Conclusão:** Os resultados obtidos nas condições experimentais empregadas neste estudo, sugerem que a LiRecDt1 não produziu efeitos deletérios importantes na excitabilidade neuronal, na transmissão neuromuscular, no processo de acoplamento-excitação contração ou na contratilidade de músculos esqueléticos. Acredita-se que a atividade fosfolipásica decorrente da ação da LiRecDT1 não tenha gerado subproduto lipídico suficiente para promover o acúmulo de derivados celulares oxidativos no músculo, conhecidos por diminuir a sensibilidade do aparelho contrátil ao cálcio e, conseqüentemente, alterar a função muscular.

Palavras-chave: *Loxosceles*, fosfolipase-D, músculo esquelético, transmissão nervosa.

## ABSTRACT

Phospholipase D is one important component of the venom of *Loxosceles* spiders. This enzyme is the mainly responsible for the deleterious effect of the poison. This enzyme catalyze the hydrolysis of membrane phospholipids and by-products generated triggers a cascade of cellular events whose effects on skeletal muscle function are still unknown. To test the hypothesis that the isoform of phospholipase-D, LiRecDt1 would lead to decreased muscle function and impair neuromuscular transmission, we used 36 Swiss mice, male adult from and maintained in the Animal Department of Biological Sciences Sector of Federal University of Paraná (UFPR). We evaluated during 130 minutes, the direct effects of LiRecDt1 or PBS (control) on the contractility of isolated electrically stimulated preparations of phrenic nerve-muscle (100 µg/ml). Also, the effects of previous inoculation (24 hours, IP 10µg/kg) with LiRecDt1 or PBS (control) on the contractility of electrically stimulated preparations of sciatic nerve-gastrocnemius muscle, gastrocnemius muscle and in isolated preparations of the diaphragm and soleus muscles, were evaluated for 50 minutes. The contractility parameters evaluated were: maximum force production of twitch and the maximum velocities of contraction and relaxation. **Results:** Throughout the time course, the direct exposure of preparations to LiRecDt1 or its prior inoculation produced no significant changes in the contractility. **Conclusion:** The results obtained in the experimental conditions used in this study suggest that LiRecDt1 produced no significant deleterious effects on neuronal excitability, neuromuscular transmission, in the process of excitation-contraction coupling or contractility of skeletal muscles. It is believed that the phospholipase activity resulting from the action of LiRecDT1 has not generated sufficient products to promote the accumulation of cellular oxidative species in muscle, known to decrease the sensitivity of the contractile apparatus to calcium and, consequently, alter muscle contraction.

Keywords : *Loxosceles* , Phospholipase-D , Skeletal muscle , Nerve transmission



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 As aranhas .....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 O Gênero <i>Loxosceles</i>.....</b>	<b>19</b>
1.2.1 Loxoscelismo.....	20
1.2.2 O veneno da aranha <i>Loxosceles</i> .....	22
1.2.3 Fosfolipases-D e a Isoforma LiRecDT1 .....	25
<b>1.3 O tecido muscular .....</b>	<b>30</b>
1.3.1 Músculo estriado esquelético .....	31
1.3.1.1 Contração muscular .....	35
1.3.1.2 Relaxamento muscular .....	40
<b>1.4 Junção muscular .....</b>	<b>42</b>
1.4.1 Transmissão neuromuscular .....	44
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
<b>2.1 Objetivos Gerais .....</b>	<b>47</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>47</b>
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1 Amostra .....</b>	<b>48</b>
<b>3.2 Toxina .....</b>	<b>48</b>
<b>3.3 Protocolos Experimentais .....</b>	<b>49</b>
3.3.1 Protocolo 1: Preparação de nervo ciático – músculo gastrocnêmio “ <i>in situ</i> ” .....	50
3.3.2 Protocolo 2: Preparação de músculo gastrocnêmio - “ <i>in situ</i> ”.....	51
3.3.3 Protocolo 3: Preparação de músculo solear - “ <i>in vitro</i> ” .....	52
3.3.4 Protocolo 4: Preparação de músculo diafragma - “ <i>in vitro</i> ”.....	53
3.3.5 Protocolo 5: Preparação de nervo frênico – músculo diafragma - “ <i>in vitro</i> ” .....	54
<b>3.4 Análise Estatística .....</b>	<b>56</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1 PREPARAÇÕES NEURO-MUSCULARES .....</b>	<b>57</b>

4.1.1	Preparação de nervo ciático–músculo gastrocnêmio - “in situ” .....	57
4.1.2	Preparação de nervo frênico–músculo diafragma - “in vitro” .	59
4.2	<b>PREPARAÇÕES MUSCULARES</b> .....	61
4.2.1	Preparação de músculo gastrocnêmio - “in situ” .....	61
4.2.2	Preparação de músculo solear - “in vitro” .....	63
4.2.3	Preparação de músculo diafragma - “in vitro” .....	65
5.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	67
6.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	74
7.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	75

## 1 INTRODUÇÃO

Os venenos estão presentes em quase todas as classes de organismos vivos, desde as mais primitivas bactérias até os vertebrados mais desenvolvidos (WESTENDORF, 1998). A composição química dos venenos e toxinas derivadas de animais é bastante complexa e a grande maioria desses compostos são farmacologicamente ativos podendo comprometer a fisiologia das células (HERZIG, 2011; WESTENDORF, 1998; SPERELAKIS, 1995). O veneno típico de cobras, escorpiões e aranhas contém aminas (histamina, serotonina e acetilcolina) que agem como agentes inflamatórios, causam dor e queda da pressão sanguínea; enzimas hialuronidases e fosfolipases, essas últimas danificam as membranas celulares e aumentam a síntese de produtos inflamatórios; e polipeptídeos que agem como neurotoxinas, miotoxinas e cardiotoxinas (WESTENDORF, 1998).

As fosfolipases presentes no veneno desses animais são enzimas que possuem a capacidade de catalisar a hidrólise dos fosfolipídios da membrana celular e deflagrar uma cascata de eventos celulares que culminam nos efeitos farmacológicos e tóxicos do veneno (LAJOIE *et al.*, 2013; CHAVES-MOREIRA, 2011a; CHAVES-MOREIRA, 2011c; WILLE *et al.*, 2013). São divididas em dois grupos: as esterases alifáticas que compreendem as fosfolipases-A<sub>1</sub>, as fosfolipases-A<sub>2</sub> e as fosfolipases-B, encontradas no veneno de cobras (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e B) e escorpiões (A<sub>2</sub>); e as fosfodiesterases que compreendem as fosfolipases-C e as fosfolipases-D, essas últimas presentes no veneno das aranhas (ROBERTS, 1996). Cada tipo de fosfolipase faz a clivagem dos fosfolipídios em diferentes regiões da molécula gerando diferentes substratos celulares e conseqüentemente, desencadeando respostas fisiológicas e/ou patológicas distintas (CHAVES-MOREIRA, 2011a).

A identificação e caracterização das toxinas presentes no veneno desses animais, bem como o conhecimento do seu mecanismo de ação, tem se transformado num precioso instrumento para a compreensão da estrutura celular e do funcionamento de órgãos e sistemas. Um exemplo disso diz respeito ao funcionamento dos canais iônicos de mamíferos que, dado a similaridade com os canais iônicos presentes nos animais-presas desses animais podem ter sua estrutura e atividade elucidada. Isso possibilita o desenvolvimento de compostos ativadores

e/ou bloqueadores como ferramenta de estudo, inclusive, com subsequente potencial terapêutico (HERZIG, 2011; CHAIM *et al.*, 2011a; CHAVES-MOREIRA, 2011; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008; RASH, HODGSON, 2002; SPERELAKIS, 1995). Exemplos de medicamentos derivados de toxinas presentes em venenos de animais são abundantes. Os venenos de cobra são exemplos de tal aplicabilidade. Suas toxinas são biologicamente ativas no sistema cardiovascular, sistema nervoso central, nas proteínas e lipídios da membrana, no sistema hemostático e muscular, tendo levado ao desenvolvimento de vários medicamentos utilizados no tratamento de diversas doenças (CHAIM *et al.*, 2011a). As fosfolipases-A presentes no veneno de cobras, por exemplo, exercem efeito direto nos músculos esqueléticos produzindo fibrilação, contratura e despolarização da membrana e por isso tem sido utilizadas como importante ferramenta de estudo para a avaliação da função muscular (CHANG *et al.*, 1972).

Técnicas de clonagem e expressão de várias isoformas de fosfolipases-D presentes no veneno das aranhas do gênero *Loxosceles* (aranha-marrom) tem possibilitado o estudo mais aprofundado dos efeitos que tais toxinas exercem sobre o organismo dos vitimados. Uma dessas isoformas, a toxina recombinante LiRecDt1, da *Loxosceles intermedia*, por exemplo, já foi empregada em estudos que avaliaram seus efeitos sobre diferentes tipos celulares – células renais, cardíacas, musculares, sanguíneas, entre outras (WILLE *et al.*, 2013; GREMSKI *et al.*, 2010; CHAIM *et al.*, 2006). As fosfolipases-D presentes no veneno das aranhas-marrom são as toxinas com atividade biológica melhor elucidada (de ANDRADE, PEDROSA *et al.*, 2005) e responsáveis pela maior parte dos efeitos deletérios decorrentes do envenenamento, dentre eles a hemólise, a dermonecrose, alterações vasculares nos rins e pulmões, ativação e/ou inibição da agregação plaquetária e respostas inflamatórias agudas (CHAVES-MOREIRA, 2011a; CHAIM *et al.*, 2011a; KUSMA, 2008; SENFF-RIBEIRO, 2008; CHAIM *et al.*, 2006; da SILVA *et al.*, 2004; de ANDRADE, de OLIVEIRA *et al.*, 1999). Apesar disso, seus efeitos sobre a função muscular esquelética ainda não foram estabelecidos. Portanto, no presente estudo, a LiRecDt1 foi utilizada com o propósito de analisar seus efeitos sobre a transmissão neuromuscular e a função muscular esquelética de camundongos através da avaliação de parâmetros relacionados à geração de força, velocidade de contração e velocidade de relaxamento desenvolvida ao longo do tempo nesses músculos.

Visto que os acidentes envolvendo as aranhas-marrom tem se tornado um problema de saúde pública principalmente no estado do Paraná (SESA/PR, 2012; PAULI *et al.*, 2009; de ANDRADE, de OLIVEIRA *et al.*, 1999), conhecer os efeitos que tais toxinas presentes no veneno desses animais desencadeiam no organismo dos vitimados possibilita uma abordagem clínica cada vez mais direta e eficaz.

## 1.1 AS ARANHAS

Excluindo os insetos, as aranhas são os invertebrados mais bem sucedidos da terra, somando quase 40 mil espécies espalhadas pelo mundo. Devido a sua grande capacidade adaptativa, podem ser encontradas em qualquer território, desde regiões polares até tropicais. Muitas, por motivos ambientais, como a destruição do seu habitat natural, tem se adaptado a viver próximo dos humanos, o que torna o contato cada vez mais frequente. Apesar da maioria das espécies serem agressivas, uma picada desse tipo de animal normalmente ocorre de forma acidental ou defensiva e apenas 1% apresenta perigo real por possuir quelíceras longas e fortes o suficiente para penetrar a pele (CHAVES-MOREIRA, 2011a; RASH, HODGSON, 2002; WESTENDORF, 1998).

Segundo dados do Ministério da Saúde (2013), existem três gêneros de aranhas de importância clínica no Brasil: *Phoneutria* (armadeira), *Latrodectus* (viúva negra) e *Loxosceles* (aranha-marrom). O envenenamento por aranhas do gênero *Loxosceles* é considerado a mais perigosa forma de aracnidismo (ULLAH, 2011). De acordo com a Secretaria de Saúde do Estado do Paraná – Sesa (2012), o *loxoscelismo*, termo usado para descrever os acidentes envolvendo a picada da aranha-marrom, tem se tornado um problema de saúde pública principalmente nos estados da região sul do Brasil.

Assim como o veneno de outros animais, como cobras e escorpiões, o veneno das aranhas tem como objetivo primário paralisar e matar a presa, mas também auxilia no processo inicial de digestão da mesma, além de servir de mecanismo de autodefesa contra predadores. Com composição bastante heterogênea, representa uma incrível fonte de substâncias biologicamente ativas e com funções fisiológicas específicas, motivo pelo qual tem se tornado objeto de

estudo de muitos pesquisadores, tanto com objetivo terapêutico como geradora de ferramentas biotecnológicas (CHAIM *et al.*, 2011a; CHAVES-MOREIRA, 2011a; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008; RASH, HODGSON, 2002).

Visto que o propósito inicial é paralisar a presa, o veneno das aranhas possui uma variedade de toxinas que atuam no sistema nervoso. Duas importantes características do tecido nervoso são a excitabilidade da membrana celular e a capacidade de transmitir sinais elétricos através de sinapses. A grande maioria das toxinas presentes no veneno das aranhas pode atuar tanto em receptores neuronais e canais iônicos como em proteínas da membrana pré-sináptica envolvidas na liberação de neurotransmissores. Sendo assim, as toxinas isoladas do veneno são classificadas de acordo com seu modo de ação (RASH, HODGSON, 2002; BERNE, LEVY, 2004; AIRES, 2008).

Existem toxinas que agem nos receptores para glutamato como antagonistas. Algumas já foram classificadas, como por exemplo, as argiotoxinas e as  $\alpha$ -agatoxinas presentes no veneno de algumas espécies de aranhas norte americanas como na *Argiope trifasciata*, *Argiope florida* e *Araneus gemma* (RASH, HODGSON, 2002); e as *PhTx-4*, uma família de sete toxinas encontradas no veneno de uma espécie de aranha armadeira brasileira (*Phoneutria nigriventer*) (MAFRA *et al.*, 1999). O L-Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos. Existem vários receptores para glutamato, classificados de duas formas: receptores ionotrópicos, que são canais iônicos ligante-dependentes seletivos aos cátions  $K^+$ ,  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$ ; e metabotrópicos que são receptores acoplados a proteína-G para formar inositol-1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) e liberar cálcio no meio intracelular ou, também, inibir a adenililciclase. São encontrados tanto na membrana pré como pós-sináptica (AIRES, 2008, BERNE, LEVY, 2004). As argiotoxinas agem nesses receptores bloqueando-os irreversivelmente, suprimindo os potenciais pós-sinápticos excitatórios (PEPS). As  $\alpha$ -agatoxinas são antagonistas não competitivos dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA no cérebro de mamíferos (RASH, HODGSON, 2002). A Tx4 é um antagonista reversível dos receptores NMDA para glutamato nas regiões cerebrocorticais de ratos (FIGUEIREDO *et al.*, 2001). Fisiologicamente esses receptores são canais altamente permeáveis ao cálcio. Sendo assim, sob a ação dessas toxinas, o aumento na

concentração intracelular de cálcio fica impedido inibindo diversas respostas celulares (AIRES, 2008; RASH, HODGSON, 2002).

Outras toxinas agem bloqueando canais de cálcio espalhados por vários tecidos do corpo. Os canais de cálcio tem relevância significativa no sistema nervoso por permitir o influxo de cálcio nas terminações nervosas e consequente liberação do neurotransmissor. Dessa forma, essas toxinas agem causando bloqueio da transmissão na junção neuromuscular por impedir a liberação do neurotransmissor na fenda sináptica. Exemplos desse tipo de toxina são as  $\omega$ -conotoxinas. Além disso, canais de cálcio ativados por voltagem presentes na membrana celular, como os receptores NMDA, e presentes dentro da célula, como os receptores rianodina do retículo sarcoplasmático das células musculares, tem importante papel no aumento da concentração de cálcio intracelular, responsável pela cascata de eventos que culmina na formação das pontes cruzadas e consequente contração dos músculos esqueléticos e cardíacos. Existem 6 subtipos de canais de cálcio ativados por voltagem (T-, L-, N-, P-, Q- e R-), baseado nas suas propriedades eletrofisiológicas e seletividade a vários íons ativadores ou inibidores. Os canais do tipo-T estão envolvidos na geração de atividade de marca-passo em neurônios e no músculo cardíaco. Canais do tipo-L são encontrados no músculo cardíaco, esquelético, na musculatura lisa vascular e no corpo e dendritos de vários neurônios centrais. Canais do tipo-N e do tipo-P estão presentes nas terminações nervosas e são responsáveis por mediar a liberação do neurotransmissor na célula pré-sináptica. Canais do tipo-R estão presentes nas terminações nervosas neurohipofisárias e em outros neurônios do sistema nervoso central (AIRES, 2008; BERNE, LEVY, 2004; RASH, HODGSON, 2002; SPERELAKIS, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 1994).

Existem, também, toxinas que agem em canais de sódio. O movimento de sódio através das membranas das células excitáveis, mediado tanto por canais de sódio ligando-dependentes (receptores colinérgicos, nicotínicos e glutamatérgicos), como por canais de sódio voltagem-dependentes são responsáveis pela rápida transmissão do impulso ao longo e entre as células excitáveis. Os canais de sódio voltagem-dependente são os mais abundantes nos nervos e nas células musculares e permitem a coordenação de processos como a locomoção e cognição. No potencial de repouso da membrana esses canais encontram-se fechados e quando se abrem,

provocam a despolarização da membrana, tornando-se logo em seguida inativos (RASH, HODGSON, 2002; BERNE, LEVY, 2004; SPERELAKIS, 1995). De acordo com Alexander e Peter (1999, citado por Rash e Hodgson, 2002), foram identificados 9 subtipos de canais de sódio em mamíferos, porém, não há uma classificação oficial definida. A toxina PhTx2 presente no veneno da aranha armadeira brasileira *Phoneutria nigriventer* mostrou ser tóxica para camundongos, provocando sintomas excitatórios como salivação, convulsões, paralisia espástica nas patas e morte (REZENDE et al., 1991). Essa mesma toxina impediu a inativação dos canais de sódio e alterou a voltagem de ativação (potencial limiar) para potenciais mais negativos nos músculos esqueléticos de sapos (ARAÚJO et al., 1993). Frações da toxina PhTx2 também foram relacionadas com a mionecrose progressiva da musculatura diafragmática e do nervo frênico em camundongos. As alterações morfológicas induzidas pela toxina incluíram aumento do volume do retículo sarcoplasmático, dano mitocondrial, desorganização dos sarcômeros, zonas de contratura e ruptura da membrana (RASH, HODGSON, 2002). O veneno de uma espécie de aranha Sul Americana (*Ancylometes sp.*) testada em nervo frênico e diafragma de rato aumentou indiretamente a amplitude dos potenciais evocados, despolarizou a membrana das fibras musculares diafragmáticas e aumentou a frequência dos potenciais em miniatura (RASH, HODGSON, 2002).

Algumas toxinas agem bloqueando os canais de potássio, como no caso das toxinas isoladas de várias espécies de tarântula. Em um estudo realizado com o objetivo de avaliar o efeito de tais toxinas nos canais de potássio presentes em miócitos ventriculares de ratos, verificou-se que a toxina HpTx 1-3 da aranha do gênero *Heteropoda venatória* causou o bloqueio desses canais prolongando a duração do potencial de ação por impedir o efluxo de potássio das células (RASH, HODGSON, 2002).

Apesar da importância funcional dos canais de cloreto para várias atividades celulares, como o controle do volume celular e acidificação de organelas intracelulares, os canais de cloreto não são cruciais para a iniciação e propagação dos potenciais de ação ou para a transmissão na junção neuromuscular. Eles atuam na regulação da excitabilidade como componentes de receptores para neurotransmissores inibitórios como o GABA (AIRES, 2008; BERNE, LEVY, 2004;



RASH, HODGSON, 2002). Poucas toxinas foram identificadas que atuam nesses canais. Estudos demonstraram que a poliamina *sFTX3.3* impediu a ativação de canais de cálcio ativados por voltagem e canais de cálcio ativados por corrente de cloro, em neurônios ganglionares de ratos (SUTTON, 1998, *apud* RASH, HODGSON, 2002).

Mesmo a menor modificação bioquímica de poucos neurônios pode resultar em profunda modificação do comportamento e, segundo Rossetto *et al.* (2004), as toxinas mais conhecidas são moléculas que exercem seus efeitos sob o tecido nervoso sendo, portanto, denominadas neurotoxinas. Dentre as neurotoxinas, está a família das fosfolipases, as neurotoxinas clostridiais e as latrotoxinas. Essas neurotoxinas bloqueiam de várias maneiras a transmissão dos impulsos nervosos. A grande maioria delas age na célula pré-sináptica, mas também existem toxinas que exercem sua ação pós-sinápticamente. Na célula pré-sináptica, as neurotoxinas se ligam a canais iônicos específicos e provocam grande alteração da permeabilidade da membrana plasmática a determinados íons, resultando na inibição indireta da neuroexocitose e bloqueio da transmissão dos sinais nervosos (ROSSETTO *et al.*, 2004). Pós-sinápticamente, as neurotoxinas ligam-se aos receptores de acetilcolina, em canais iônicos e à acetilcolinesterase, bloqueando ou alterando a transmissão colinérgica (ROSSETTO *et al.*, 2004; RASH, HODGSON, 2002). Em vertebrados, a ação da acetilcolina (Ach) como neurotransmissor autonômico e de neurônios motores está bem estabelecida. A Ach também é um importante neurotransmissor central tanto em vertebrados como em invertebrados (RASH, HODGSON, 2002; OSBORNE, 1996). Os receptores para Ach são de dois tipos: nicotínico e muscarínico. Os receptores nicotínicos estão localizados nos gânglios autonômicos dos sistemas nervosos simpático e parassimpático, na junção neuromuscular e na medula suprarrenal. São canais iônicos ligando-dependentes e produzem excitação. Os receptores muscarínicos estão localizados no coração, no músculo liso e nas glândulas. São receptores acoplados a proteína-G com ação inibitória no coração, e excitatória no músculo liso e nas glândulas (AIRES, 2008; RASH, HODGSON, 2002; OSBORNE, 1996; SPERELAKIS, 1995).

Outras toxinas são conhecidas por sua capacidade de estimular a liberação de neurotransmissores de uma variedade de nervos e causar depleção das

vesículas sinápticas tanto em vertebrados como em invertebrados (RASH, HODGSON, 2002; PUMPLIN, REESE, 1977). Essas toxinas agem aumentando o influxo de cálcio nas terminações nervosas e essas, por sua vez, provocam a fusão das vesículas com a membrana pré-sináptica liberando o neurotransmissor na fenda sináptica. Como resultado pode haver bloqueio da transmissão nervosa se o neurotransmissor liberado for do tipo inibitório ou hiperestimulação caso o neurotransmissor seja do tipo excitatório (RASH, HODGSON, 2002; REYES-LUGO *et al.*, 2009). Um estudo que avaliou os efeitos neurotóxicos do veneno da aranha viúva marrom (*Latrodectus geometricus*) em camundongos, mais especificamente da latrotoxina, revelou desordens neurológicas espásticas na musculatura esquelética, causadas pela liberação maciça de neurotransmissores, alterações em canais iônicos e inibição da reciclagem das vesículas (REYES-LUGO *et al.*, 2009; WESTENDORF, 1998).

Grande parte das proteínas tóxicas e peptídeos isolados do veneno das aranhas tem efeito neurotóxico e miotóxico, porém, toxinas dermonecróticas, enzimas e aminas biogênicas (histamina) também estão presentes nos venenos de aranha. Estudos demonstram que essas substâncias promovem alterações histológicas nas células, hemólise, resposta inflamatória, aumento da permeabilidade vascular, reações alérgicas, necrose tecidual local e também em sítios distantes, como no miocárdio e na musculatura esquelética (RASH, HODGSON, 2002; CHAIM *et al.*, 2011a; CHAVES-MOREIRA, 2011a; WESTENDORF, 1998). Uma fosfolipase-A (OHV A-PLA) isolada do veneno de cobra, mas com características similares a fosfolipases encontradas em venenos de vários tipos de animais foi testada em camundongos por sua habilidade de causar alterações patológicas no miocárdio, na musculatura esquelética e no gânglio cardíaco. Nesse experimento foi observado degeneração de miofibrilas e necrose, tanto no músculo esquelético quanto cardíaco e redução na população de vesículas sinápticas dos terminais nervosos pré-ganglionares no gânglio cardíaco. As alterações incluíram dissolução dos filamentos de actina e miosina, dilatação e desorganização do retículo sarcoplasmático e degeneração de mitocôndrias. As lesões foram mais severas no músculo esquelético. Algumas das miofibrilas ficaram severamente desorganizadas e perderam a típica aparência estriada, houve ruptura de sarcômeros e destruição da maior parte das mitocôndrias (HUANG, GOPALAKRISHNAKONE, 1996). Estudos

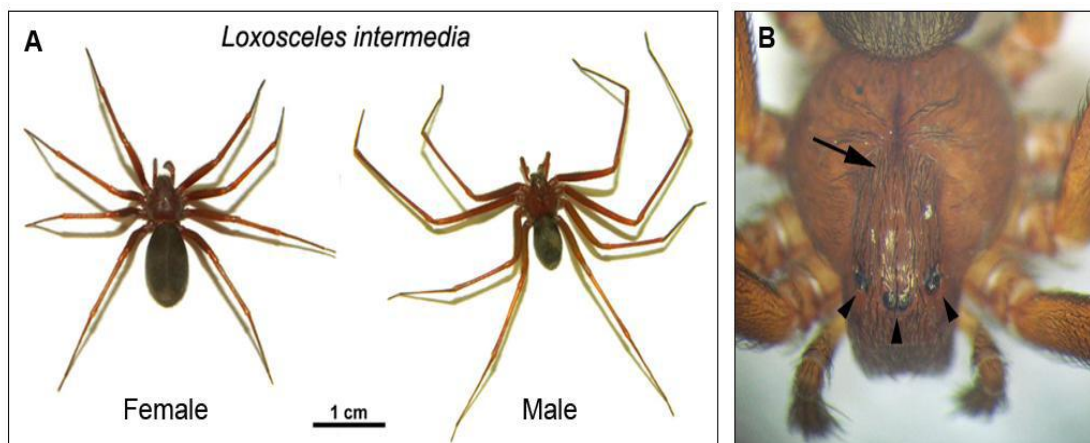
histopatológicos realizados em coelhos submetidos ao veneno da aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*) apresentaram resultados similares (OSPEDAL *et al.*, 2002). A fosfolipase- A também mostrou-se capaz de provocar a degeneração da bainha de mielina por destruir progressivamente as camadas de células de Schwann que a formam (MARTIN, ROSENBERG, 1968).

## 1.2 O GÊNERO *LOXOSCELES*

As aranhas do gênero *Loxosceles*, pertencentes à família *Sicariidae*, são vulgarmente denominadas de aranha-marrom devido a sua coloração que varia entre tons de marrom claro e escuro (Figura 1A). Evidências mostram que as aranhas desse gênero derivam de um antigo ancestral que habitou o continente Africano e Sul Americano antes da sua separação. São encontradas em praticamente todos os continentes, mas é no continente americano que foi catalogado o maior número de espécies, cerca de 50 na América do Norte e mais de 30 na América do Sul (GREMSKI, 2014; CHAIM *et al.*, 2011a; TAVARES *et al.*, 2011; CHAVES-MOREIRA, 2011a; da SILVA *et al.*, 2004). Segundo Fischer (2007, citado por Chaves-Moreira, 2011), no continente americano o gênero *Loxosceles* é dividido em cinco grupos com base na radiação evolutiva: *reclusa*, *laeta*, *gaucho*, *spadicea* e *amazônica*. Com exceção do grupo *reclusa*, todas as espécies de aranha pertencentes aos demais grupos são encontradas no Brasil e outras já foram identificadas, dentre elas a *Loxosceles intermedia*, predominante no município de Curitiba, estado do Paraná (CHAVES-MOREIRA, 2011a; PAULI *et al.*, 2009).

Características anatômicas relevantes das aranhas *Loxosceles* incluem o cefalotórax em forma de violino e a presença de três pares de olhos organizados num padrão em forma de U (Figura 1B). O período de vida das *Loxosceles* varia de 3 a 7 anos, sobrevivem por vários dias e até meses à escassez de alimentos e água, além de suportarem grandes variações de temperatura. São pouco agressivas, possuem hábitos noturnos e preferência por locais escuros e inabitados. O desequilíbrio ambiental faz com que essas aranhas encontrem no ambiente domiciliar um excelente local para sobrevivência e reprodução, o que têm

aumentado muito sua população e os acidentes envolvendo tais espécies (CHAIM *et al.*, 2011a; TAVARES *et al.*, 2011; CHAVES-MOREIRA, 2011a; da SILVA *et al.*, 2004).



**Figura 1.** Aspecto da aranha-marrom. **(A)** coloração característica. **(B)** formato de violino padrão no cefalotórax dorsal (seta maior); 3 pares de olhos em forma de U (setas menores). Adaptado de Chaim, et al., 2011a.

### 1.2.1 Loxoscelismo

Loxoscelismo é o termo usado para definir o acidente, bem como o quadro clínico apresentado pelo indivíduo vítima de envenenamento por picada da aranha-marrom (PAULI *et al.*, 2009; da SILVA *et al.*, 2004; FUTRELL, 1992). O loxoscelismo tem se tornado um problema de saúde pública na região sul do Brasil (PAULI *et al.*, 2009; de ANDRADE, de OLIVEIRA *et al.*, 1999) e ocupa o segundo lugar no “ranking” dos acidentes causados por picada de animais peçonhentos no estado do Paraná, dos quais Curitiba responde por mais da metade dos casos (SESA, 2012).

Tais acidentes ocorrem com maior frequência nos meses mais quentes do ano, entre a primavera e o verão, que corresponde ao seu período reprodutivo (CHAIM *et al.*, 2011a; da SILVA *et al.*, 2004). O contato ocorre, na maioria das vezes, enquanto as pessoas estão se vestindo ou dormindo, acometem mais o sexo

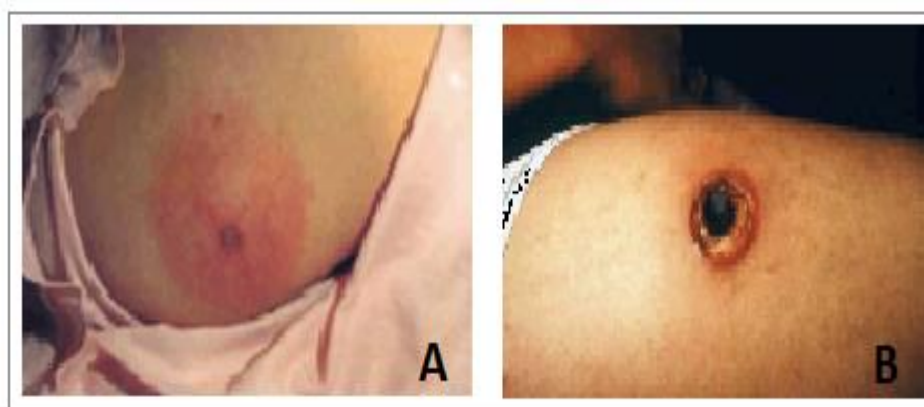
feminino e indivíduos adultos com idade entre 20 e 40 anos (CHAVES-MOREIRA, 2011a; da SILVA *et al.*, 2004).

O quadro clínico pode se manifestar de duas formas: cutâneo ou dermonecrótico, em 84-97% dos casos; e cutâneo visceral ou sistêmico, em 3-16% dos casos. A gravidade do acidente depende de vários fatores, como a espécie de aranha-marrom, seu sexo, seu estágio de desenvolvimento e a quantidade de veneno inoculado (GREMSKI, 2014; PAULI *et al.*, 2009; de OLIVEIRA, 2005; BARBARO, 2005; da SILVA *et al.*, 2004). Segundo Kusma (2008), o volume de veneno inoculado em uma picada é mínimo (1-2 µl) e contém na ordem de dezenas de microgramas de proteínas. *Loxosceles intermedia* fêmeas produzem mais veneno que os machos e isto pode estar relacionado ao seu maior peso e comprimento - dimorfismo sexual. Além disso, o veneno das fêmeas causa mais severas reações dermonecróticas em ratos, quando comparado com o veneno dos machos (CHAVES-MOREIRA, 2011a; de OLIVEIRA, 2005; da SILVA *et al.*, 2004). Também devem ser consideradas as características genéticas do indivíduo vitimado, sua sensibilidade ao veneno, seu estado nutricional, o local da picada e o tempo transcorrido desde o acidente até o início do tratamento, o que é decisivo para a determinação da gravidade do acidente. Picadas nas extremidades corporais são mais comuns e também mais severas. Em geral, a forma cutânea ou dermonecrótica oferece menor risco, porém, a forma sistêmica é potencialmente fatal, principalmente se a abordagem clínica não se der de forma rápida e objetiva (CHAVES-MOREIRA, 2011a; PAULI *et al.*, 2009; da SILVA *et al.*, 2004).

O quadro cutâneo caracteriza-se por uma lesão necrótica que se desenvolve na região da picada seguida, após 2 a 8 horas, de dor do tipo “queimação”, prurido, edema e áreas hemorrágicas (Figura 2.). Após 3 a 5 dias há acúmulo de leucócitos na área de lesão, formação de abscesso e ulceração da ferida, podendo evoluir para formação de escara e instalação de sequelas deformantes (FUTRELL, 1992; CHAVES-MOREIRA, 2011a; CHAIM *et al.*, 2011a; de OLIVEIRA, 2005).

O quadro cutâneo visceral ou sistêmico é a forma mais grave de loxoscelismo e pode vir acompanhado de lesão dermonecrótica. Os sintomas sistêmicos incluem cefaleias, convulsões, astenia, vômito, febre, alterações

sensoriais e coma. Nos casos mais graves pode haver anemia hemolítica, trombocitopenia, coagulação intravascular disseminada, insuficiência renal aguda e alterações vasculares nos pulmões e fígado. Esses sinais clínicos normalmente se instalam dentro de 24 horas podendo levar à morte rapidamente caso não sejam adotadas as medidas terapêuticas necessárias (FUTRELL, 1992; PAULI *et al.*, 2009; da SILVA *et al.*, 2004; CHAVES-MOREIRA, 2011a; CHAIM *et al.*, 2006; de OLIVEIRA, 2005).



**Figura 2.** Característica da lesão dermonecrótica decorrente da picada da aranha-marrom. **A:** algumas horas após a picada; **B:** 7 dias após a picada.

**Fonte:** Adaptado de Sesa/PR, 2014.

<http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=357>

### 1.2.2 O veneno da aranha *Loxosceles*

O veneno loxoscélico é sintetizado por um par de glândulas situadas no cefalotórax da aranha-marrom e consiste em uma mistura complexa de peptídeos e proteínas de massa molecular variando entre 5-40 kDa, além de íons, sais minerais, aminoácidos livres, aminas, poliaminas neurotóxicas e neurotransmissores. Alguns de seus componentes não possuem caráter tóxico, enquanto outros, como os membros da família de fosfolipases, possuem característica tóxica bem determinada. Os peptídeos neurotóxicos tem massa molecular entre 5-10 kDa e as proteínas dermonecróticas, como as fosfolipases-D, tem massa molecular entre 30-40 kDa. O volume do veneno é mínimo (cerca de 4µl) e a massa protéica produzida pelas glândulas varia entre as espécies, podendo conter entre 65 e 100 µg de proteínas

(FUTRELL, 1992; da SILVA *et al.*, 2004; CHAVES-MOREIRA, 2011a; CHAIM *et al.*, 2011a; SAMS *et al.*, 2001). Estudos realizados com o objetivo de identificar as toxinas presentes no veneno das aranhas *Loxosceles* revelaram a presença de metaloproteases, fosfolipases-D, hialuronidases, serino-proteases, além de lipase, esterase, fosfatase alcalina e 5'-ribonucleotídeo-fosfohidrolase. Tais toxinas atuam de forma sinérgica para gerar seus efeitos, de forma que uma única picada é suficiente para levar a um quadro de envenenamento letal (da SILVA *et al.*, 2004; CHAVES-MOREIRA, 2011a; CHAIM *et al.*, 2011a; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008).

Proteínas da família Loxtox, as fosfolipases-D, são as proteínas melhor caracterizadas encontradas no veneno das *Loxosceles* e são responsáveis pela maior parte dos efeitos tóxicos do veneno (DIAS-LOPES *et al.*, 2010; KALAPOTHAKIS *et al.*, 2007; de ANDRADE, PEDROSA *et al.*, 2005). São elas as principais responsáveis pela dermonecrose. Apresentam atividade esfingomielinásica, podem promover e/ou inibir a agregação plaquetária, geram edema, hemólise, hiperpermeabilidade vascular, anticoagulação, convulsões, hipotensão, hemorragia interna, miotoxicidade, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e letalidade (da SILVA *et al.*, 2004; CHAVES-MOREIRA, 2011a; CHAIM *et al.*, 2011a; CHAIM *et al.*, 2011b; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011b). Como proposto por Murakami (2006, citado por Ullah, 2011), as fosfolipases-D presentes no veneno das aranhas podem ser classificadas em duas classes. Os membros da classe I possuem uma única ponte dissulfeto e uma alça hidrofóbica estendida, enquanto as proteínas da classe II contêm uma ponte de dissulfeto intra-cadeia adicional e exibe diminuição da atividade catalítica para os fosfolipídios. O veneno da *L. intermedia* mostrou-se capaz de degradar, fragmentar e romper a estrutura da membrana basal em células tumorais EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) (da SILVA *et al.*, 2004). Estudos histopatológicos de músculos esqueléticos de coelhos submetidos ao veneno da *Loxosceles intermedia* mostraram várias regiões marcadas por infiltração de leucócitos e neutrófilos, edema muscular e mionecrose de várias miofibrilas (OSPEDAL *et al.*, 2002).

Outro grupo de toxinas presentes no veneno da aranha-marrom e que merecem destaque são as metaloproteases tipo astacinas – Loxolisina A e Loxolisina B. A atividade biológica dessas toxinas parece estar associada aos distúrbios

hemostáticos, hemorragia da derme, lesão dos vasos sanguíneos, interferência na adesão plaquetária e na dificuldade de cicatrização das lesões cutâneas (FEITOSA *et al.*, 1998). Serino-proteases e hialuronidases também foram identificadas. As primeiras são capazes de degradar a gelatina e a caseína enquanto as outras promovem a extensão das lesões dermonecroticas e espalhamento gravitacional (CHAVES-MOREIRA, 2011a; GREMSKI *et al.*, 2010). Também faz parte do conjunto de toxinas da *L. intermedia* um alérgeno que possui grande similaridade com alérgenos presentes em outras espécies de artrópodes e que pode, além de desencadear reação alérgica, participar do “*Rash*” cutâneo observado no loxoscelismo (CHAVES-MOREIRA, 2011a).

Isoformas de peptídeos inseticidas encontradas no veneno de *Loxosceles intermedia* (*LiTx1*, *LiTx2*, *LiTx3* e *LiTx4*) agem no sistema nervoso de presas e predadores, causando paralisia e até mesmo morte pela interação com canais iônicos neuronais específicos, receptores e transportadores localizados nas membranas das células excitáveis. Esses peptídeos são classificados de acordo com sua ação, assim como, pelos seus efeitos nos canais de sódio, cálcio, potássio e cloreto. Como os canais iônicos estão envolvidos no controle do fluxo iônico transmembrana, na geração e manutenção do potencial de membrana e, consequentemente, em diversas funções celulares, a ação desses peptídeos pode comprometer atividades como o acoplamento excitação-contração, a secreção de hormônios e neurotransmissores, a expressão gênica, entre outros. Apesar de um grande número de peptídeos inseticidas terem sido caracterizados em várias espécies de aranha, pouco se sabe sobre essas moléculas no gênero *Loxosceles* (GREMSKI *et al.*, 2010; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011a; ALBERTS *et al.*, 2008).

Em um estudo realizado por Dias-Lopes *et al.* (2010), observou-se que o veneno da *Loxosceles intermedia* se distribui rapidamente nos diferentes tecidos de camundongos, sendo que os mais altos níveis foram detectados durante os primeiros 30 minutos após a injeção. As mais altas concentrações do veneno foram detectadas nos rins, seguido do coração, pulmões e fígado. Os mecanismos pelos quais o veneno das *Loxosceles* causam os efeitos deletérios locais e sistêmicos continuam sob investigação. Essas toxinas desenvolvem dermonecrose em humanos, porcos e coelhos e, em ratos e camundongos, não (da SILVA *et al.*, 2004; BABCOCK, 1981).



Em camundongos o veneno da *L. intermedia* mostrou ser o mais letal e o da *L. laeta*, o de menor letalidade (da SILVA *et al.*, 2004).

### 1.2.3 Fosfolipases-D e a Isoforma LiRecDT1

As fosfolipases-D (PLD) presentes no veneno das aranhas-marrom são consideradas os agentes primários responsáveis pelo loxoscelismo (LAJOIE *et al.*, 2013). A dermonecrose, as respostas inflamatórias alteradas, a hemólise e a agregação plaquetária são efeitos decorrentes da picada da aranha-marrom atribuídos às várias isoformas de fosfolipases-D presentes no veneno. A importância dessa família de toxinas na biologia dessas aranhas é sustentada por dados que demonstram que aproximadamente 20% do total de mRNAs transcritos sinalizam para as fosfolipases-D (WILLE, *et al.*, 2013; ULLAH, 2011; GREMSKI *et al.*, 2010; KUSMA, 2008).

Em camundongos, a mortalidade pela *Loxosceles* é atribuída a fosfolipase-D e na forma sistêmica de loxoscelismo a falência renal aguda é uma das complicações mais evidentes em grande parte das vítimas. Os mediadores lipídicos gerados no tecido renal exposto à fosfolipase-D tornam as membranas celulares mais vulneráveis ao estresse fisiológico o que pode contribuir para o dano renal (KUSMA, 2008; CHAIM *et al.*, 2006).

No veneno bruto cada isoforma de fosfolipase-D apresenta uma atividade deletéria que atua sinergicamente com a atividade das outras isoformas (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Para fins de estudo desses efeitos, isoformas de fosfolipases-D de *Loxosceles intermedia* foram clonadas e expressas como toxinas recombinantes em modelos bacterianos (as LiRecDTs) a partir de um banco de cDNA obtido do veneno coletado da glândula desses animais. Existem várias isoformas de LiRecDTs clonadas até o momento, sendo que a LiRecDT1 é a que apresenta o mecanismo de ação melhor elucidado (WILLE, *et al.*, 2013; GREMSKI *et al.*, 2010; KUSMA, 2008; CHAIM *et al.*, 2011; da SILVA *et al.*, 2004).

As toxinas fosfolipases-D ligam-se às superfícies das células de mamíferos e possuem atividade enzimática contra os fosfolipídios da membrana (LAJOIE *et al.*,

2013). As membranas biológicas são formadas basicamente por uma bicamada lipídica e por proteínas integrais incorporadas a ela ou associadas à membrana através da fixação em grupos lipídicos. Além de definir os limites das células e das organelas intracelulares e manter as diferenças de concentração iônica entre os meios intra e extracelular e entre o citosol e o interior das organelas, as membranas e seu constituinte lipídico são essenciais para as funções celulares e participantes indispensáveis em muitos eventos de transdução de sinais. (WILLE, *et al.*, 2013; ALBERTS *et al.*, 2008; EYSTER, 2007; GOSH, 1997).

Os lipídios constituem cerca de 50% da massa das membranas celulares na maior parte dos animais. Existem 3 classes principais de lipídios da membrana plasmática: glicolipídios, colesterol e fosfolipídios (glicerofosfolipídios e esfingofosfolipídios) (ALBERTS *et al.*, 2008) sendo que os fosfolipídios são os mais abundantes (EYSTER, 2007; GOSH, 1997). O conteúdo de lipídios difere de uma célula para outra. A quantidade de esfingomielina na membrana corresponde a cerca de 2-15% do total de fosfolipídios (ABE, KOBAYASHI, 2013). Sabe-se que os nervos periféricos, por exemplo, possuem uma quantidade maior de esfingomielina quando comparado à quantidade presente em outras células (ALBERTS *et al.*, 2008). Além disso, análises comparativas da atividade da enzima que dá início a biosíntese dos esfingolipídios - serina palmitoiltransferase (SPT) – “de novo síntese”, em microssomos isolados de vários tecidos de ratos, mostram que os microssomos dos músculos esqueléticos exibem o segundo mais alto nível de atividade SPT, perdendo apenas para os pulmões. Tais dados sugerem que os músculos esqueléticos são muito ativos na síntese de esfingolipídios apesar dessa síntese ser afetada por diversos fatores como a prática de exercícios, a dieta e o tipo de fibra muscular que compõem o músculo. Dieta rica em ácido palmítico e indivíduos obesos, por exemplo, apresentam a síntese aumentada (NIKOLOVA-KARAKASHIAN, REID, 2011).

Algumas regiões da membrana apresentam altas concentrações de esfingomielina e colesterol formando os chamados “lipid rafts” e alguns componentes proteicos de vias de transdução de sinais tem afinidade por essas estruturas (EYSTER, 2007). A transdução de sinais envolve todos os eventos moleculares nos quais sinais extracelulares provocam uma resposta intracelular. Os mensageiros

químicos que participam da sinalização podem ser tanto de natureza hidrossolúvel como lipossolúvel. Mensageiros químicos hidrossolúveis não podem atravessar as membranas celulares, de modo que suas mensagens devem ser transduzidas através da membrana. Já os mensageiros lipossolúveis podem atravessar as membranas celulares e se comunicar diretamente com o conteúdo da célula através da ligação a receptores intracelulares. Adicionalmente, sobre influência de estímulo específico (como o gerado pelas fosfolipases-D), constituintes das membranas biológicas podem gerar substratos que são submetidos a alterações bioquímicas enviando sinais para o interior da célula (ALBERTS *et al.*, 2008; EYSTER, 2007; GOSH, 1997).

As PLDs são consideradas enzimas fosfolipases devido a sua capacidade de catalisar a hidrólise tanto dos esfingofosfolipídeos (esfingomiéline, principalmente) como dos glicerofosfolipídeos (lisofosfatidilcolina e fosfatidilcolina) da membrana. Por ação da fosfolipase-D a esfingomiéline é hidrolisada gerando como subproduto ceramida1-fosfato + colina. A hidrólise da lisofosfatidilcolina e da fosfatidilcolina gera como subproduto ácido lisofosfatídico + colina e ácido fosfatídico + colina (WILLE, *et al.*, 2013; LAJOIE *et al.*, 2013; KUSMA, 2008; ALBERTS *et al.*, 2008). A colina corresponde a porção inativa da molécula hidrolisada enquanto o ácido lisofosfatídico, ácido fosfatídico e a ceramida vão atuar ativamente no processo de transdução de sinais. O ácido fosfatídico originado no ambiente celular é metabolicamente convertido em diacilglicerol (DAG) e/ou ácido lisofosfatídico enquanto a ceramida1-fosfato é convertida em esfingosina1-fosfato. Essas moléculas por sua vez, agem como segundo mensageiros dentro das células via proteínas-G, ativação de proteínas cinases-C (PKC) e liberação de cálcio do retículo endoplasmático, ativando diferentes cascatas de sinalização e modulando uma variedade de eventos biológicos e patológicos cujos efeitos são tipo celular dependentes e incluem desde a proliferação, diferenciação e até apoptose celular (WILLE, *et al.*, 2013; ABE, KOBAYASHI, 2013; LAJOIE *et al.*, 2013; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011c; ULLAH, 2011; KUSMA, 2008; ALBERTS *et al.*, 2008; GOSH *et al.*, 1997).

Wille *et al.* (2013), demonstrou em estudo com cultura de células “B16-F10-ghost”, que a fosfolipase-D recombinante (LiRecDT1) hidrolisa preferencialmente

a esfingomielina e a lisofosfatidilcolina e que a esfingomielina é hidrolisada mais rapidamente e com mais eficiência que os demais fosfolipídeos da membrana. Após 30 minutos de exposição à LiRecDT1 foram observados os mais altos níveis de hidrólise dos fosfolipídeos e esse nível se manteve elevado por 24 horas (WILLE *et al.*, 2013).

A esfingomielina (SM) é sintetizada a partir da fosfatidilcolina e da ceramida pela atividade de uma esfingomielina sintase (SMS), que é codificada por dois genes, SMS<sub>1</sub> e SMS<sub>2</sub>. A SMS<sub>1</sub> sintetiza a maior parte da SM no lúmen do aparelho de Golgi, enquanto a SMS<sub>2</sub> produz SM localmente na membrana plasmática. Camundongos SMS<sub>1</sub>-null exibem um fenótipo grave, incluindo letalidade neonatal moderada, redução do peso corporal e perda de massa gorda, enquanto que camundongos SMS<sub>2</sub>- Knockout exibem obesidade induzida pelo elevado teor de gordura e resistência a insulina, sem quaisquer anormalidades aparentes. Esses estudos sugerem que a SM gerada pelas SMSs está envolvida em vários eventos celulares (ABE, KOBAYASHI, 2013).

Evidências indicam que as esfingomielinas da membrana plasmática agem como uma espécie de reservatório de moléculas lipídicas sinalizadoras (ceramida, ceramida-1-fosfato, esfingosina e esfingosina-1-fosfato) (ABE, KOBAYASHI, 2013). A ceramida, produto da hidrólise da SM por diversas esfingomielinases (SMases) e a esfingosina, produto da clivagem da ceramida por ceramidases promovem a interrupção do ciclo celular, senescência e apoptose celular (ABE, KOBAYASHI, 2013; FERREIRA *et al.*, 2012). A ceramida-1-fosfato proveniente da fosforilação da ceramida está envolvida na regulação do crescimento e inflamação. A esfingosina pode ser convertida em esfingosina-1-fosfato que medeia a sobrevivência celular, a migração e proliferação celular e a angiogênese (ABE, KOBAYASHI, 2013).

De acordo com Ferreira *et al.* (2010 e 2012), nos músculos esqueléticos a ceramida também prejudica a captação muscular de glicose, interrompe a fosforilação oxidativa mitocondrial e estimula a produção de derivados celulares oxidantes de espécies reativas a oxigênio (ROS). Essa sinalização oxidante pode gerar efeitos deletérios, como demonstrado através da exposição “*in vitro*” de miotúbulos e músculo diafragma de camundongos à esfingomielinase. Nestes, a SMase exógena aumentou a geração de ceramida no músculo levando a liberação

mitocondrial de ROS no citosol e alterando a função das proteínas miofibrilares. Com isso o músculo ficou mais suscetível ao desenvolvimento de fadiga e devido à diminuição da sensibilidade do aparato contrátil ao cálcio, um menor número de pontes cruzadas se formou, resultando em fraqueza muscular durante a eletroestimulação (FERREIRA *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2012). Segundo Callahan e colaboradores (2001), o peróxido de hidrogênio, o superóxido e os radicais de hidroxila são os derivados celulares oxidantes responsáveis por tais efeitos nos músculos esqueléticos.

Peixoto (2013), avaliou os efeitos diretos e sistêmicos da LiRecDt1 sobre os músculos cardíaco e liso de ratos através da análise de parâmetros de contratilidade como geração de força e pressão, velocidade máxima de contração e de relaxamento. Foram utilizadas preparações de músculos papilares e anéis de aorta (para verificação dos efeitos diretos) e corações isolados perfundidos (para avaliação dos efeitos sistêmicos). Para a avaliação dos efeitos sistêmicos os animais foram pré-tratados com a LiRecDt1 via intraperitoneal (240 µg/kg) e para a avaliação dos efeitos diretos as preparações foram submetidas diretamente a toxina (8,3 e 16,6 µg/ml) no momento do experimento. Os resultados obtidos com esse estudo demonstraram que em corações isolados de animais pré-tratados, a administração intraperitoneal de LiRecDt1 reduziu o valor máximo da pressão intraventricular e a velocidade máxima de relaxamento. Não foram observados efeitos diretos da toxina em parâmetros de contratilidade de músculos papilares isolados e anéis de aorta. Esses dados sugerem que o efeito deletério causado pela fosfolipase-D no músculo cardíaco foi decorrente de alterações sistêmicas que comprometeram de maneira indireta a função muscular (PEIXOTO, 2013).

No músculo cardíaco de camundongos, o efeito do veneno bruto da *Loxosceles intermedia* foi mais pronunciado que o da toxina (LiRecDt1) isolada, o que segundo Dias-Lopes *et al.* (2010), se deve à presença de outros componentes tóxicos agindo de forma sinérgica, por exemplo a hialuronidase. Houve decréscimo da contratilidade cardíaca em decorrência da atividade esfingomielinásica, da subsequente geração de ceramida 1-fosfato e aumento da concentração intracelular de cálcio o que foi demonstrado pela diminuição da tensão sistólica (DIAS-LOPES *et al.*, 2010).

Essa sinergia entre os componentes do veneno também pôde ser verificada em um estudo que comparou os efeitos do veneno bruto e da toxina isolada (LiRecDt1) sobre a função hepática. Neste, ratos *Wistar* receberam injeções subcutâneas tanto do veneno bruto (80 µg) como da LiRecDt1 (80 µg) e foram avaliados após 6 e 12 horas. No grupo que recebeu o veneno, os hepatócitos ficaram tumefatos e ocorreu apoptose. Houve infiltração leucocitária na região portal combinada com um elevado grau de esteatose em 12 horas. No grupo submetido à toxina as alterações histológicas foram mais discretas e o metabolismo hepático foi modificado apenas no grupo que recebeu o veneno. Estes resultados mostram que o veneno é hepatotóxico e que a toxina dermonecrótica é apenas parcialmente responsável por tal efeito (CHRISTOFF *et al.*, 2008).

Em eritrócitos humanos a fosfolipase-D gerou hemólise. Em estudo realizado por Chaves-Moreira (2011c), pode-se verificar que a hemólise foi decorrente do metabolismo dos fosfolipídios da membrana e do aumento da concentração de cálcio intracelular. Observou-se que esse aumento do cálcio intracelular foi mediado por canais de cálcio do tipo-L e que a hemólise aumentou de forma proporcional ao aumento na concentração de cálcio (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011c).

Já no estudo realizado por Wille *et al.* (2013), as células “B16-F10-ghost” submetidas a LiRecDt1 não exibiram nenhuma alteração da viabilidade e não sofreram qualquer tipo de modificação morfológica, lise ou dano celular, mesmo em concentrações elevadas de LiRecDT1 (100, 200 e 300 µg/ml por 24, 48 e 72 horas). Estes achados sugerem que a ação da toxina é tipo celular dependente e que os efeitos deletérios da fosfolipase-D sobre a estrutura da célula e de suas membranas é variado (WILLE *et al.*, 2013).

### 1.3 O Tecido Muscular

O tecido muscular é responsável pela maior parte de nossas interações com o meio externo e é também elemento efetuator de uma variedade de funções internas (RHOADES, TANNER, 2005; AIRES, 2008). As células musculares são altamente especializadas na conversão de energia química em energia mecânica.

Como resultado há geração de força e realização de trabalho (BERNE, LEVY, 2004). A contração muscular é fenômeno celular. O encurtamento do músculo resulta do encurtamento de suas células individuais e a força que o músculo produz representa a soma das forças geradas por suas células (RHOADES, TANNER, 2005).

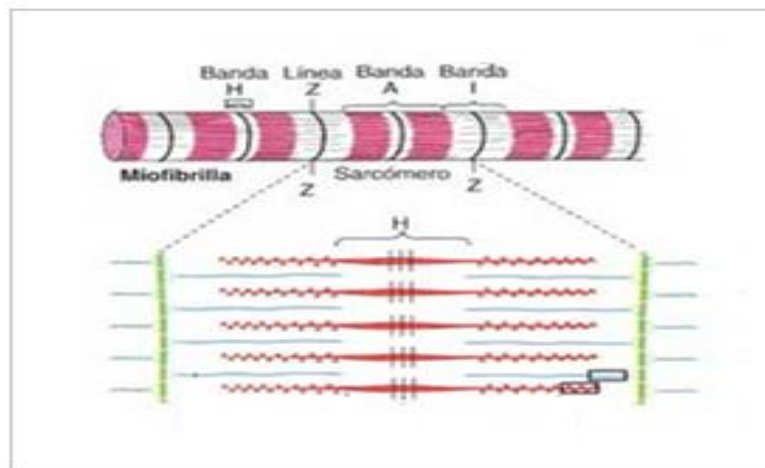
Como o trabalho muscular pode tomar muitas formas, tais como locomoção, bombeamento de sangue e peristaltismo, os músculos são tecidos altamente especializados, apresentando tanto similaridades quanto diferenças com relação a sua organização, mecanismo de contração e função (BERNE, LEVY, 2004; RHOADES, TANNER, 2005). Porém, alguns dos princípios básicos da contração se aplicam a todos os tipos de músculos (GUYTON, HALL, 2006; RHOADES, TANNER, 2005).

### 1.3.1 Músculo estriado esquelético

O músculo estriado esquelético desempenha um papel central em numerosas atividades como a manutenção da postura, locomoção, fala e respiração. Possui abundante suprimento de mitocôndrias que é vital para o fornecimento de energia, na forma de ATP, ao sistema contrátil (BERNE, LEVY, 2004; RHOADES, TANNER, 2005). É um tecido extremamente organizado e o padrão regular e periódico das estriações transversas se relaciona intimamente com o seu modo de funcionamento (RHOADES, TANNER, 2005). Os músculos estriados são conjuntos de centenas ou milhares de células alongadas, multinucleadas e que se comportam como uma só unidade, as fibras musculares. Cada fibra muscular é formada por unidades menores, as miofibrilas, onde estão as moléculas contráteis (AIRES, 2008). As miofibrilas são caracterizadas por uma rede paralela e altamente organizada de filamentos espessos e delgados, polímeros das proteínas miosina e actina, respectivamente (FARAH, REINACH, 1995). Esses filamentos se interdigitam, com disposição longitudinal e transversal em sarcômeros. As unidades repetidas de sarcômeros são responsáveis pelo padrão estriado peculiar do músculo esquelético (AIRES, 2008).

A estrutura complexa e extremamente ordenada do sarcômero é a maquinaria elementar de produção de força dos músculos estriados (TSKHOVREBOVA, TRINICK, 2010). A teoria dos filamentos deslizantes da contração muscular foi proposta 50 anos atrás quando do início da aplicação de técnicas de difração de raios-X para o estudo da estrutura muscular e dos mecanismos de contração (HUXLEY, 2004). Porém, estudos recentes sobre a organização do sarcômero, das suas proteínas e das interações moleculares resultantes têm fornecido novos “*insights*” sobre os eventos envolvidos no mecanismo da contração muscular (TSKHOVREBOVA, TRINICK, 2010).

O sarcômero é a unidade contrátil básica do músculo. É limitado pelas linhas Z, contém uma banda A em seu centro e uma metade de duas bandas I em cada lado da banda A (Figura 3).



**Figura 3.** Estrutura do sarcômero. Fonte: Adaptado de Guyton e Hall, 2006.

Nas bandas A concentram-se os filamentos espessos. As bandas I contêm os filamentos delgados. Os filamentos espessos e delgados podem se sobrepor na banda A. Essas áreas de sobreposição são sítios potenciais para a formação das pontes cruzadas (COSTANZO, 2008; RHOADES, TANNER, 2005; VINOGRADOVA *et al.*, 2005; GORDON, 2000). Durante a contração muscular, o filamento espesso desliza ao longo do filamento delgado levando ao encurtamento do sarcômero



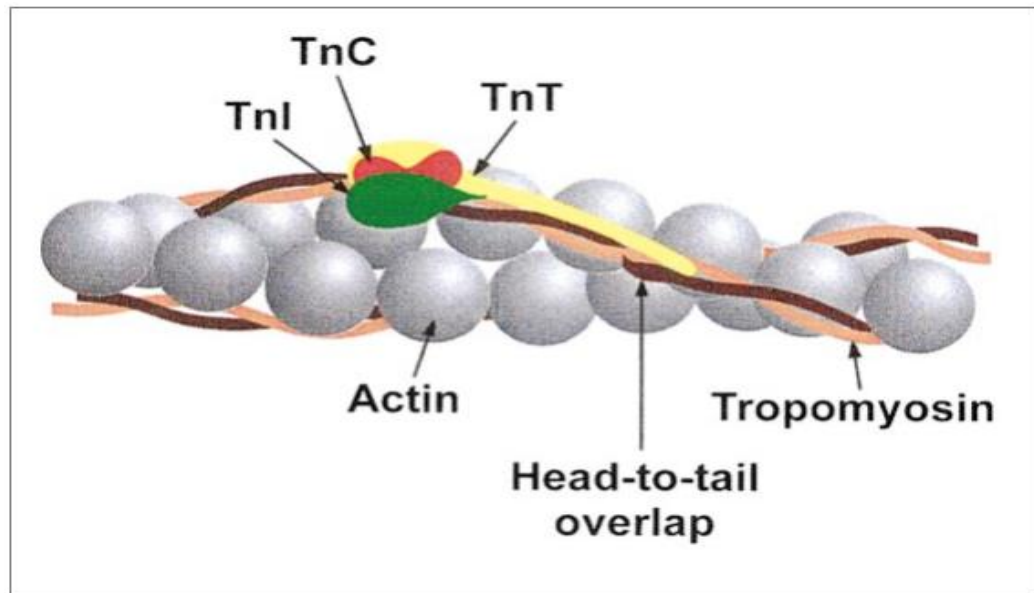
(VINOGRADOVA *et al.*, 2005; GORDON, 2000; SCHIAFFINO, REGGIANI, 1996). Na banda H, que fica no centro do sarcômero, não existem filamentos delgados. Consequentemente não se formam pontes cruzadas nessa região. A linha M divide a banda H ao meio e contém proteínas que ligam os filamentos espessos (COSTANZO, 2008; RHOADES, TANNER, 2005).

A miosina que forma o filamento espesso é uma proteína composta de duas cadeias pesadas, cada uma com massas moleculares de 200 kDa e quatro cadeias leves, com massas moleculares de 20 kDa cada. Das cadeias leves, duas são chamadas de “cadeias leves essenciais – ELC” e as outras duas de “cadeias leves reguladoras – RLC” (GORDON, 2000). As cadeias pesadas da miosina são formadas por uma porção (subfragmento 2 - S2) que corresponde a “cauda” da miosina e por porções terminais globulares (subfragmento 1 - S1) conhecidas como “cabeças” da miosina. Em cada cabeça da miosina liga-se um par de cadeias leves (ELC e RLC) (GORDON, 2000; SCHIAFFINO, REGGIANI, 1996; FARAH, REINACH, 1995). Com essa conformação as cabeças da miosina são projetadas para fora do filamento em intervalos regulares que em músculos estriados de vertebrados é de ~14,3 nm (GORDON, 2000).

O filamento delgado é constituído pela troponina, tropomiosina e actina (Figura 4). O trabalho pioneiro de Hanson e Lowy (1963), revelou a geometria básica dos filamentos de actina. A actina é uma proteína de forma globular e nos filamentos delgados ela é polimerizada em dois filamentos torcidos em estrutura  $\alpha$ -helicoidal. Cada hélice possui 13 monômeros de actina em 6 voltas (hélice 13/6). A actina possui um sítio fixador para a região S1 (cabeça) da miosina que encontra-se recoberto pela tropomiosina (Tm) quando o músculo está em repouso (VINOGRADOVA *et al.*, 2005; GORDON, 2000; SQUIRE, 1998; FARAH, REINACH, 1995; HANSON, LOWY, 1963).

A tropomiosina desempenha um papel fundamental na regulação da contração. A posição da Tm no filamento fino determina a interação da miosina com a actina, ou seja, se o sítio de ligação da actina estará aberto para a miosina e se a ligação será fraca (eletrostática) ou mais forte (interações hidrofóbicas). A tropomiosina é uma proteína filamentar que cursa ao longo do sulco de cada filamento de actina. Cada molécula de tropomiosina interage com sete monômeros

de actina e possui um complexo de troponina associado (VINOGRADOVA *et al.*, 2005; RHOADES, TANNER, 2005; GORDON, 2000; BING *et al.*, 1997; FARAH, REINACH, 1995).



**Figura 4.** Geometria básica dos filamentos delgados. Troponina I (**TnI**); Troponina C (**TnC**); Troponina T (**TnT**). Fonte: Gordon, 2000.

A troponina é um complexo de três proteínas globulares: troponina T (TnT), troponina I (TnI) e troponina C (TnC) (Figura 4). A troponina T conecta a troponina à tropomiosina. A troponina I inibe a interação entre a actina e a miosina através da inibição do ciclo miosina-ATPase quando em baixas concentrações de cálcio citoplasmático. A troponina C é a proteína que responde ao aumento na concentração de cálcio removendo a inibição da TnI. O  $\text{Ca}^{2+}$  se liga de forma reversível à TnC promovendo a interação da actina com a miosina. Sendo assim, os íons cálcio e o complexo troponina exercem papel central na regulação da contração. Segundo Bing, (1997) o cálcio regula tanto a velocidade como a fração de filamentos que se movem e ambos os efeitos são desencadeados por diferentes interações entre a TnI, TnT e TnC (BING *et al.*, 1997). Um modelo bem conhecido da regulação da contração pela troponina é o que descreve um descolamento do segmento inibitório da troponina (TnI) da actina em resposta à fixação do cálcio na TnC. Esse destacamento da TnI promoveria uma mudança conformacional do

filamento delgado deslocando a tropomiosina cerca de 25° e expondo os sítios de fixação da actina à miosina. Ebashi e colaboradores (1969), foram os primeiros a localizar o sítio de fixação do cálcio no filamento delgado e denominá-lo de troponina (AIHARA *et al.*, 2010; VINOGRADOVA *et al.*, 2005; GORDON, 2000; SQUIRE, 1998; BING *et al.*, 1997; FARAH, REINACH, 1995; EBASHI *et al.*, 1969).

#### 1.3.1.1 Contração muscular

A contração muscular é o resultado de uma sequência de sinalização molecular, iniciada por potenciais de ação em um motoneurônio, que leva a liberação de um neuromediador, acetilcolina no caso dos músculos esqueléticos, na região de contato entre o músculo e o neurônio. Esse neuromediador interage com receptores nicotínicos presentes na membrana da célula muscular resultando em despolarização da superfície da membrana e subsequente geração de um potencial de ação (AIRES, 2008; LAVER, 2005; SQUIRE, 1998).

O mecanismo que traduz o potencial de ação muscular em produção de tensão é o chamado **acoplamento excitação-contração** (LAVER, 2005; BERNE, LEVY, 2004). Nele, o potencial de ação é propagado, por meio de correntes locais, para os *túbulos T*, contínuos com a membrana e em contato íntimo com as fibras musculares, despolarizando-os (LAVER, 2005; BERNE, LEVY, 2004; FRANZINI-ARMSTRONG, 1999). Essa despolarização provoca uma alteração conformacional em dois tipos de canais de cálcio que possuem papel central no processo de contração, o receptor *diidropiridínico* (DHPR, canal de cálcio voltagem dependente tipo-L) localizado nos túbulos-T, que interage com os receptores de *rianodina* (RyRs) do retículo sarcoplasmático (RS). Essa interação promove a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares (do RS), levando ao aumento da concentração desse íon no citoplasma da célula muscular (BEARD *et al.*, 2009; ZALK *et al.*, 2007; LAVER, 2005; ENDO, 2009; FRANZINI-ARMSTRONG, 1999). No músculo esquelético essa interação entre DHPR e RyRs parece ocorrer através de acoplamento físico, enquanto no músculo cardíaco, os RyRs são ativados por íons cálcio que fluem do espaço extracelular através dos DHPR (BEARD *et al.*, 2009; ZALK *et al.*, 2007; FRANZINI-ARMSTRONG, 1999).

Existem dois subtipos de receptores diidropiridínicos, a isoforma DHPR $\alpha$ 1s presente no músculo esquelético e a isoforma DHPR $\alpha$ 1c encontrada no músculo cardíaco. As respostas inflamatórias sistêmicas (sepsis) são causas comuns de disfunção contrátil e em estudo realizado com músculo diafragma de ratos verificou-se que a sepsis induzida por fármacos levou à diminuição significativa dos níveis de expressão dos DHPR $\alpha$ 1s e dos RyR1, ambos presentes nos músculos esqueléticos. Essa diminuição, segundo os autores, pode ser um dos fatores responsáveis pela redução da força dos músculos respiratórios e pelo quadro de fadiga muscular encontrado nos indivíduos com sepsis (JIAO *et al.*, 2013).

Em todos os tipos de músculos, o receptor RyR do RS forma o centro de um grande complexo multiproteína que contém componentes extracelulares, citoplasmáticos e luminais com o RS. Dessa forma, o complexo RyR funciona como uma espécie de sensor do ambiente, inclusive das concentrações de cálcio em cada um dos três compartimentos, regulando apropriadamente a sua liberação (BEARD *et al.*, 2009). Além disso, associadas à porção citoplasmática do receptor encontram-se cinases, fosfatases, fosfodiesterases, entre outras, que participam do processo de transdução de sinais regulando a atividade do canal via segundo mensageiros (ZALK *et al.*, 2007). No lúmen do RS existem três proteínas associadas ao complexo RyR: a calsequestrina (CSQ, a maior proteína ligadora de cálcio, com alta capacidade e baixa afinidade), a junctina e a triadina (co-proteínas que ligam a CSQ aos RyRs e ditam sua atividade) (BEARD *et al.*, 2009; FRANZINI-ARMSTRONG, 1999).

Em mamíferos três isoformas de RyRs foram clonadas e sequenciadas. A isoforma RyR-1 é encontrada principalmente nos músculos esqueléticos, a RyR-2 no músculo cardíaco e a RyR-3 em muitos outros tipos de células (JIAO *et al.*, 2013; ZALK *et al.*, 2007; LAVER, 2005; ENDO, 2009; PROTASI *et al.*, 2000). O desenvolvimento da fadiga muscular tem sido associado a uma depressão do transiente de cálcio intracelular decorrente da hiperfosforilação da proteína cinase-A (PKA) associada ao receptor RyR. Além disso, mutações do receptor RyR podem ocorrer em algumas formas de miopatia e são causa frequente de complicações durante a anestesia inalatória (ZALK *et al.*, 2007). Os RyRs são regulados principalmente pelo nível de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e ATP do citoplasma. No músculo

esquelético, o RyR-1 é ativado por aproximadamente  $1\mu\text{M Ca}^{2+}$  e inibido por cerca de  $1\text{mM Ca}^{2+}$  no citoplasma. Os íons  $\text{Mg}^{2+}$  inibem os RyRs por competir com o cálcio pelos sítios de ativação ou pelo fechamento do canal através da ligação em sítios de inibição. O ATP, por sua vez, é um forte ativador dos RyRs e juntamente com o cálcio pode causar ativação quase que completa dos receptores (ZALK *et al.*, 2007; LAVER, 2005; ENDO, 2009).

Uma vez tendo  $\text{Ca}^{2+}$  livre no citoplasma este fixa-se a troponina C. A troponina C então, desloca a tropomiosina expondo os sítios fixadores da actina. Actina e miosina interagem para formar as pontes cruzadas. Esse acoplamento leva ao deslizamento dos filamentos espessos e delgados entre si (AIHARA *et al.*, 2010; COSTANZO, 2008; VINOGRADOVA *et al.*, 2005; BERNE, LEVY, 2004; GORDON, 2000; FARAH, REINACH, 1995). A “cabeça” da miosina é deslocada cerca de  $45^\circ$ , provocando o movimento dos filamentos de actina em direção ao centro do sarcômero, resultando na aproximação das linhas Z, encurtamento do sarcômero e consequente contração das fibras musculares (VINOGRADOVA *et al.*, 2005; BERNE, LEVY, 2004, SQUIRE, 1998). O cliço se repete enquanto houver  $\text{Ca}^{2+}$  ligado a troponina C. Para que ocorra a contração, a atividade ATPásica da cabeça da molécula de miosina cliva ATP em ADP +  $\text{P}_i$ , que é utilizado como fonte de energia para puxar os filamentos acoplados (AIRES, 2008; FITTS, 2008; GORDON, 2000; SQUIRE, 1998; BING *et al.*, 1997; GEEVES, CONIBEAR, 1995). Moss (1986), sugeriu que as pontes cruzadas podem permanecer fixadas aos filamentos finos e serem arrastadas ao longo de distâncias entre 60 – 80 nm além da sua posição de equilíbrio antes que sejam destacadas forçadamente do filamento. Esse “arrasto” adicional pode retardar a velocidade de encurtamento muscular (MOSS, 1986).

Bing e colaboradores (1997), demonstraram em músculos esqueléticos e cardíacos que o incremento nos níveis de cálcio citoplasmático leva ao recrutamento de mais pontes cruzadas. Como cada ciclo das pontes cruzadas desloca ainda mais a miosina ao longo do filamento de actina, maior é o encurtamento dos sarcômeros e maior é a produção de força. Por outro lado, estudos realizados por Lamb e colaboradores (1994), e reproduzidos por Chin e Allen (1996), demonstraram que o aumento nas concentrações de cálcio para níveis

próximos a  $1\text{mM Ca}^{2+}$  pode abolir o acoplamento excitação-contração e resultar em alterações na estrutura da junção túbulos-T/retículo sarcoplasmático (tríade) comprometendo a função muscular. Acredita-se que os incrementos no nível de cálcio podem ativar proteases específicas (calpainas) conhecidas por serem ativadas após o exercício (BELCASTRO, 1993) e causar a hidrólise dos canais liberadores de cálcio *in vitro* (GILCHRIST *et al.*, 1992). O aumento de íons  $\text{H}^+$ , em decorrência da queda do pH celular, reduz o número de pontes cruzadas com ligações fortes em fibras musculares fásicas (tipo II – rápidas) e a força com que as pontes cruzadas ciclam em ambos os tipos de fibras musculares. O aumento da temperatura corporal potencializa esse efeito inibitório da redução do pH sobre as pontes cruzadas (FITTS, 2008). A redução do pH e o aumento da temperatura corporal podem ocorrer tanto em situações patológicas, como no caso de sepsis (resposta inflamatória sistêmica) (JIAO *et al.*, 2013), quanto em situações de excesso de atividade física (alta intensidade e/ou tempo prolongado) (FITTS, 2008).

A quantidade de força gerada pelo músculo depende, entre outros fatores, do estado de tensão inicial em que suas fibras se encontram - *comprimento ideal*. Quando a contração inicia em comprimentos maiores ou menores do que o comprimento ideal há perda de força resultante (AIRES, 2008). Isso ocorre porque a tensão ativa desenvolvida é proporcional ao número de pontes cruzadas formadas (GORDON, 2000; BING *et al.*, 1997; FITTS *et al.*, 1991). Sendo assim, a tensão é máxima quando existe grau máximo de sobreposição dos filamentos espessos e delgados e o máximo possível de pontes cruzadas. Quando o músculo é estimulado a contrair, mas encontra-se estirado até comprimentos maiores que o seu ideal, o número possível de pontes cruzadas a serem formadas fica diminuído e consequentemente, a tensão ativa é reduzida. Inversamente, quando o comprimento do músculo é reduzido, os filamentos finos colidem uns com os outros no centro do sarcômero, reduzindo o número possível de pontes cruzadas, diminuindo a tensão ativa (COSTANZO, 1999).

Segundo Gordon (2000), em contrações isométricas nem todos os subfragmentos S1- cabeças da miosina, podem se ligar à actina. Mensurações sugerem que apenas 20-40% de todas as cabeças da miosina se ligam ao filamento fino durante uma contração isométrica máxima. Se assim for, apenas 0,75 - 1,5 de

cabeças de miosina estão ligadas por unidade reguladora sob condições de total ativação isométrica (GORDON, 2000). Durante o encurtamento sem carga, o número de pontes cruzadas ligadas e ciclando caem para menos de um terço do número de pontes cruzadas ciclando em condições isométricas. Sendo assim, presume-se que nessas condições, apenas 1 cabeça de miosina se liga a cada 15-30 actinas, o que corresponde em média a 1 porção S1 se ligando a cada duas unidades regulatórias (FITTS, 2008; GORDON, 2000; GEEVES, CONIBEAR, 1995).

O aumento do número de unidades motoras que se contraem simultaneamente, fenômeno chamado *somação espacial* também promove o aumento da força gerada pelo músculo. A eficiência do recrutamento de unidades motoras também pode ser aumentada em decorrência do aumento da frequência dos potenciais de ação (*somação temporal*). Desse modo, potenciais de ação sucessivos atingem o músculo antes de o relaxamento atingir um percentual importante e assim a contração subsequente será maior, até atingir um platô para cada frequência (AIRES, 2008; FITTS *et al.*, 1991). Altas frequências de estimulação, porém podem produzir contrações sustentadas denominadas “tetânicas”. Na contração tetânica o nível de cálcio intracelular não diminui, resultando na fixação continuada de cálcio à troponina C e na formação contínua das pontes cruzadas porque não há tempo suficiente para que a SERCA do RS reacumule o  $\text{Ca}^{2+}$ . (AIRES, 2008; BERNE, LEVY, 2004). Um músculo submetido à estimulação com altas frequências por tempo prolongado torna-se mais susceptível a desenvolver fadiga por depleção dos estoques de cálcio intracelulares (CHIN, ALLEN, 1996; FITTS *et al.*, 1991).

O pico de força e potência desenvolvida pelo músculo também depende de fatores ligados a sua arquitetura tais como: o tamanho e comprimento da fibra muscular; o tipo de fibra predominante (tipo I: tônicas – lentas ou tipo II: fásicas - rápidas); o ângulo de fixação fibra – tendão; a relação força-velocidade ( $df/dt$ ); e a relação força-frequência. Fibras de contração lenta e rápida têm capacidades semelhantes para gerar tensão específica. No entanto, as fibras rápidas mostram um pico de velocidade máxima ( $V_{max}$ ), uma  $df/dt$  e uma potência inicial consideravelmente maior. A alta  $V_{max}$  da fibra de contração rápida é

provavelmente devido à atividade ATPase miofibrilar alta da cabeça da miosina (FITTS, 2008; FITTS *et al.*, 1991).

#### 1.3.1.2 Relaxamento muscular

Para que ocorra o relaxamento muscular, o nível de cálcio citoplasmático precisa ser reduzido para valores próximos ao basal (cerca de  $1\mu\text{M}$ ) (ENDO, 2009). Segundo Geeves e Conibeart (1995), em níveis basais de cálcio, o estado bloqueado do sítio de ligação da actina na miosina predomina (com quase 80% das actinas nessa forma). Do restante, cerca de 20% dos sítios encontram-se fechados e menos de 5% abertos. Isso previne qualquer ligação significativa da S1 à actina, pois nessas condições a tropomiosina está bloqueando a grande maioria dos sítios de ligação (GEEVES, CONIBEART, 1995).

Dois mecanismos estão envolvidos na redução dos níveis citoplasmáticos de cálcio: o trocador sódio/cálcio (NCX) da membrana sarcoplasmática (de menor contribuição - 28% da remoção) e a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) do RS responsável pelo bombeamento da maior parte do cálcio do citosol (aproximadamente 70%) para o seu depósito intracelular, o retículo sarcoplasmático (BERS, 2002).

A SERCA está presente nas membranas do RS tanto de células de animais como de plantas, embora seu conhecimento nessa última seja escasso. Essa bomba compartilha as propriedades catalíticas das ATPases íon-motrízes da família do tipo P (*"P-type family"*), mas possuem diferentes propriedades de regulação. A SERCA é codificada por uma família de três genes, SERCA-1, SERCA-2 e SERCA-3, que são altamente conservados, mas localizados em diferentes cromossomos. Existem várias isoformas de SERCA e essas isoformas exibem especificidade, sugerindo que elas contribuem para propriedades fisiológicas únicas dos tecidos nas quais são expressas (PERIASAMY, KALYANASUNDARAM, 2007).

As fibras musculares do tipo I (tônicas, lentas) contém apenas a isoforma SERCA-2, enquanto as fibras do tipo II (fásicas, rápidas) contém apenas SERCA-1. A taxa de recaptção de cálcio pela SERCA-1 é maior quando comparada à da



SERCA-2, o que está em concordância com a atividade ATPásica característica de cada tipo de fibra muscular onde essas isoformas estão presentes (LAMBOLEY *et al.*, 2014).

Evidências bioquímicas e biofísicas tem demonstrado que a recaptação de cálcio para o lúmen do RS pela SERCA requer a troca de  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{H}^{+}$  em sítios de baixa afinidade ao cálcio. O aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  no lúmen do RS para valores acima da sua constante de dissociação ou a redução da concentração de  $\text{H}^{+}$ , por uma elevação no pH, diminuem a troca  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  reduzindo a recaptação de cálcio pela SERCA. Sendo assim, situações ou estados patológicos que causem alteração no pH celular, por exemplo na “sepsis”, podem alterar o funcionamento da SERCA, comprometendo a função muscular (INESI, TADINI-BUONINSEGNI, 2014). Além disso, o próprio processo de envelhecimento tende a reduzir tanto a expressão quanto a atividade da SERCA, contribuindo para a alteração nos níveis de recaptação de cálcio (PERIASAMY, KALYANASUNDARAM, 2007).

A função da SERCA é modulada por moléculas endógenas: fosfolambano (PLB) e sarcolipina (SLN) que são expressas tanto no músculo esquelético, como no músculo liso e cardíaco, porém em diferentes graus. Ambas, SLN e PLB são inibidores da SERCA, ou seja, inibem a recaptação de cálcio para o RS (PERIASAMY, KALYANASUNDARAM, 2007). A SLN é expressa em alto grau em músculos de contração rápida, tanto em humanos quanto em coelhos, enquanto a PLB é altamente expressa em músculos de contração lenta e no músculo cardíaco (TUPLING *et al.*, 2002). Um aumento ou diminuição na expressão ou na atividade dessas moléculas impactam diretamente na capacidade de recaptação do cálcio para o RS e conseqüentemente, na função muscular. Tupling e colaboradores (2002), em estudo realizado com músculos soleares de ratos submetidos à SLN exógena, observaram redução significativa de vários parâmetros de contratilidade como força máxima de contração ( $P_t$ ), força tetânica ( $P_0$ ), velocidade de contração ( $+df/dt$ ) e velocidade de relaxamento ( $-df/dt$ ). Tais achados indicam que a expressão aumentada da SLN prejudica a função contrátil do músculo por inibir a SERCA e diminuir os estoques de cálcio do retículo sarcoplasmático (TUPLING *et al.*, 2002). Já Bluhm e colaboradores (2000), em estudo realizado com músculos papilares de camundongos “*fosfolambano knockout*” observaram aumento dos parâmetros de

contratilidade muscular, mostrando a repercussão da retirada do efeito inibitório da PLB sobre a SERCA-2a.

#### 1.4 Junção neuromuscular

A junção neuromuscular (JNM) é uma das sinapses mais amplamente estudada e tem servido de base para a compreensão da transmissão de informações e consequente comunicação entre neurônios e células efetoras tanto do sistema nervoso central quanto do periférico (FAGERLUND, ERIKSSON, 2009). A JNM é responsável pela transmissão química para o músculo dos impulsos elétricos gerados nos nervos, a fim de desencadear adequada contração muscular (FAGERLUND, ERIKSSON, 2009; MEIR *et al.*, 1999). Claude Bernard em sua série de estudos sobre os efeitos do curare em preparações neuromusculares foi o primeiro a descrever o fenômeno da neurotransmissão e a presença de compostos químicos com a função de transmitir essa informação do nervo para o músculo (FAGERLUND, ERIKSSON, 2009).

A JNM tem uma arquitetura celular e molecular complexa que envolve regiões especializadas em promover a liberação sustentada de neurotransmissores em várias cargas, assegurando adequada neurotransmissão (FAGERLUND, ERIKSSON, 2009). Consiste em três partes distintas: a terminação nervosa motora distal, também chamada de porção pré-sináptica; a fenda sináptica; e a porção pós-sináptica que compreende uma região da membrana do músculo denominada de “placa motora”. No músculo esquelético a informação é transmitida através da liberação instantânea de acetilcolina (ACh) do nervo e ativação dos receptores nicotínicos para acetilcolina (nAChRs), que são canais ligando-dependentes de ação rápida presentes no músculo e localizados na região da placa motora (FAGERLUND, ERIKSSON, 2009; BERNE, LEVY, 2004).

A porção pré-sináptica consiste na parte distal do neurônio motor, isto é, a porção terminal e desmielinizada do axônio do nervo motor (FAGERLUND, ERIKSSON, 2009). É projetada e desenvolvida para garantir a síntese, incorporação em vesículas, liberação e recaptação de neurotransmissores, além de possibilitar o transporte de íons através da membrana. A energia necessária para estes processos

é gerada por uma grande população de mitocôndrias presente no citoplasma tipicamente visíveis por microscopia eletrônica (FAGERLUND, ERIKSSON, 2009; AIRES, 2008).

A acetilcolina é sintetizada a partir de acetato e colina e empacotada em vesículas por transporte ativo (FAGERLUND, ERIKSSON, 2009; AIRES, 2008). As vesículas são armazenadas em dois locais principais: um está localizado em um sítio ativo perto da membrana da célula pré-sináptica e imediatamente em frente ao receptor pós-sináptico de acetilcolina da membrana muscular, o que favorece a liberação, difusão pela fenda sináptica e ligação ao receptor específico. As outras vesículas são armazenadas em posição mais remota e têm de ser transportadas através do citoesqueleto para os locais de liberação (FAGERLUND, ERIKSSON, 2009).

A fenda sináptica consiste num espaço de aproximadamente 50 nm entre a terminação nervosa e a membrana muscular e é formada por uma lâmina basal composta por uma multiplicidade de moléculas de grandes dimensões, tais como a acetilcolinesterase, que degrada a acetilcolina, várias isoformas da alfa e beta-laminina e colágeno que interagem e modulam a neurotransmissão. A acetilcolinesterase ancorada à lâmina degrada rapidamente a ACh em acetato e colina inativando-a e portanto regulando a neurotransmissão (FAGERLUND, ERIKSSON, 2009; AIRES, 2008).

A porção pós-sináptica está localizada imediatamente à frente da terminação nervosa e consiste em uma região altamente especializada da membrana pós-sináptica com múltiplas dobras, primárias (rasas) e secundárias (mais profundas) que aumentam em muito a superfície de transmissão de sinais. Na superfície dessas dobras concentram-se os receptores para acetilcolina (nAChRs) – nicotínicos em alta densidade que estão ancorados na membrana da célula por um sistema complexo de proteínas do citoesqueleto, dentre elas, os distroglicanos. Em estreita proximidade com a membrana pós-sináptica está a chamada zona perijuncional. Essa parte da JNM tem uma função essencial na transdução do sinal para as regiões adjacentes e mais internas da membrana muscular (túbulos-T). Tipicamente, a zona perijuncional tem uma maior densidade de canais de sódio do que em outras partes da membrana celular, fazendo com que esta parte da membrana seja capaz de amplificar as

respostas à despolarização e, assim, promover o processo de transdução que finalmente leva a contração do músculo (FAGERLUND, ERIKSSON, 2009).

#### 1.4.1 Transmissão neuromuscular

Neurotransmissão é o termo utilizado para definir a “conversa cruzada” neuronal que permite a passagem da informação entre neurônios (FAGERLUND, ERIKSSON, 2009). Porém, os neurônios não são capazes de transmitir informações na forma de ondas sonoras, mecânicas ou radiação eletromagnética (luz), por exemplo. Dessa forma, faz-se necessário a atividade de estruturas especializadas na conversão desses estímulos iniciais para uma linguagem comum ao sistema nervoso, os sinais elétricos. A essa conversão dá-se o nome de *transdução* e são os *receptores sensoriais* e as terminações nervosas que realizam essa função. Quando essa informação é transmitida do nervo para o músculo dá-se o nome de transmissão neuromuscular (AIRES, 2008).

Os impulsos nervosos ou potenciais de ação (PA) são os mecanismos dos quais o sistema nervoso lança mão para transmitir os sinais através da membrana. Na maioria das terminações nervosas o PA é gerado por variações na permeabilidade iônica da membrana causados pela abertura de canais de sódio voltagem-dependentes (AIRES, 2008; MEIR *et al.*, 1999). Um PA é capaz de se propagar sem diminuição da intensidade ao longo dos prolongamentos dos neurônios. Para que o potencial de ação conduza um impulso elétrico sem perda ao longo de todo o comprimento do axônio, ele se regenera a medida que é conduzido ou seja, novos potenciais vão sendo gerados e propagados ao longo da fibra (AIRES, 2008; BERNE, LEVY, 2004).

Quando um potencial de ação chega ao terminal do nervo distal, os canais de cálcio voltagem-dependentes (VDCCs), localizados ali em alta densidade, se abrem para gerar o influxo de cálcio (FAGERLUND, ERIKSSON, 2009; PARDO *et al.*, 2006; FLINK, ATCHISON, 2003; GIOVANNINI *et al.*, 2002). Em repouso a concentração de cálcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ) é muito baixa ( $\sim 10^{-7}$  M), mas com a despolarização a concentração aumenta substancialmente. Além do influxo de cálcio, a liberação de cálcio a partir dos estoques intracelulares também podem afetar a

[ $Ca^{2+}$ ]<sub>i</sub> (MEIR *et al.*, 1999). Quanto maior o influxo de cálcio, maior a liberação do neurotransmissor e maior a magnitude da resposta pós-sináptica (MEIR *et al.*, 1999; LLINÁS *et al.*, 1981). Acredita-se que cerca de 60 canais de cálcio precisam se abrir para causar a liberação de um quantum ou vesícula de acetilcolina (MEIR *et al.*, 1999).

O tipo de canal de cálcio que controla a liberação de Ach na junção neuromuscular de mamíferos não é fixo. Predominantemente, a liberação de Ach das terminações nervosas na JNM de mamíferos adultos é mediada por canais de cálcio tipo-P/Q (PARDO *et al.*, 2006; GIOVANNINI *et al.*, 2002). Os canais de cálcio tipo-R e tipo-N podem contribuir para a liberação de Ach sob condições específicas como em situações de ablação ou mutações dos canais tipo-P/Q (PARDO *et al.*, 2006). Canais de cálcio tipo-L podem desempenhar um papel na liberação de Ach em JNMs normais e também sob condições patológicas como por exemplo, na esclerose lateral amiotrófica e no envenenamento por toxina botulínica e iberiotoxina (FLINK, ATCHISON, 2003; GIOVANNINI *et al.*, 2002). Portanto, o recrutamento de subtipos alternativos de VDCCs para compensar a alteração na liberação de ACh parece representar uma forma comum de plasticidade neuronal. No entanto, o tipo de regulação feita pelos VDCCs não é constante e a plasticidade difere entre as sinapses do sistema nervoso central e as sinapses periféricas (PARDO *et al.*, 2006; FLINK, ATCHISON, 2003; GIOVANNINI *et al.*, 2002).

A concentração de cálcio aumentada localmente na terminação nervosa é detectada por sinaptotagminas específicas, associadas com a membrana das vesículas contendo acetilcolina, que medeiam a formação de complexos de três proteínas (SNARE proteínas): sinaptobrevina, syntaxina e proteína associada a sinaptossomas (SNAP – 25) que, em última instância levam à ancoragem das vesículas, fusão e posterior liberação do neurotransmissor na fenda sináptica (FAGERLUND, ERIKSSON, 2009; MEIR *et al.*, 1999).

A liberação do neurotransmissor é dependente da duração e da amplitude da despolarização pré-sináptica (MEIR *et al.*, 1999; LLINÁS *et al.*, 1981) e ocorre cerca de 200  $\mu$ s após o influxo de cálcio (LLINÁS *et al.*, 1981). Em condições de repouso, potenciais de placa terminal em miniatura (PEPs) são gerados no lado pós-sináptico da JNM de forma espontânea, resultado do lançamento de um pequeno

número de vesículas contendo acetilcolina – liberação quântica. Quando um potencial de ação chega ao terminal do nervo, várias centenas de vesículas são lançadas simultaneamente, resultando em um somatório de PEPs. Se a amplitude deste potencial de placa terminal for grande o suficiente para atingir o limiar de excitabilidade da célula muscular, ocorre a geração e propagação do potencial de ação (PA) ao longo da membrana pós-sináptica levando, conseqüentemente, à liberação de cálcio no interior do músculo e à interação actina-miosina que resulta em contração muscular (FAGERLUND, ERIKSSON, 2009; AIRES, 2008; BERNE, LEVY, 2004). Segundo Llinás e colaboradores (1981), após cerca de 1ms da geração de um PA pré-sináptico é observado o pico de um PA pós-sináptico.

Como a forma e a amplitude do potencial de ação nervoso geralmente não se alteram, somente variações na frequência dos potenciais de ação podem ser utilizados como código para a transmissão de informação ao longo do axônio. A frequência máxima é limitada pela duração do período refratário absoluto (cerca de 2 ms) a cerca de 500 impulsos por segundo em nervos grossos de mamíferos (BERNE, LEVY, 2004).

A velocidade de condução nervosa é afetada pelo diâmetro da fibra e pela mielinização. Fibras nervosas com maior diâmetro apresentam uma maior velocidade de condução, pois a resistência exercida pelas membranas das fibras é menor. Fibras mielinizadas também apresentam maior velocidade de condução. Isso ocorre porque a bainha de mielina que reveste alguns axônios funciona como um isolante elétrico. Nos axônios, a bainha de mielina é interrompida a cada 1 a 2 mm pelos *nódos de Ranvier*. Nesses locais concentram-se grande quantidade de canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , que participam do potencial de ação. Sendo assim, o potencial de ação é regenerado somente nos nódos de Ranvier, conferindo a condição denominada de condução saltatória. Dessa forma, a bainha de mielina aumenta a velocidade de condução por elevar a constante de comprimento do axônio e diminuir a capacitância (COSTANZO, 2008; AIRES, 2008; BERNE, LEVY, 2004; BAKER et al., 1987).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos da toxina LiRecDT1 da aranha marrom (*Loxocceles intermedia*) sob a condução nervosa e atividade muscular esquelética de camundongos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em preparações de músculo diafragma, nervo frênico-músculo diafragma, músculo gastrocnêmio, nervo ciático-músculo gastrocnêmio e músculo solear de camundongos (“*in vitro*” e “*in situ*”), através de estimulação elétrica direta (via músculo) e indireta (via nervo motor) em condições isométricas, na presença e na ausência da toxina LiRecDT1:

1. A força muscular absoluta gerada ao longo do tempo;
2. A velocidade máxima de contração ( $+df/dt$ ) desenvolvida ao longo do tempo;
3. A velocidade máxima de relaxamento ( $-df/dt$ ) desenvolvida ao longo do tempo.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 AMOSTRA

O estudo avaliou uma amostra de 36 indivíduos, composta de camundongos *Swiss* machos, adultos e pesando em média 35 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e mantidos sob condições controladas de temperatura, umidade e iluminação, tendo livre acesso a água e ração. A investigação se deu conforme o estabelecido pelo Guia de Uso e Cuidados de Animais de Laboratório, publicado pelo US National Institutes of Health, (NIH Publicação No. 85-23, revisado em 1996), após participação e aprovação no “Curso de Manipulação de Animais de Experimentação” e perante aprovação pelo CEUA/Bio da UFPR, sob o número 656. Após cada experimento, os animais foram encaminhados ao setor de descarte de material biológico da UFPR.

#### 3.2 TOXINA

A toxina recombinante da aranha marrom (LiRecDT1) foi fornecida pelo Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos sob responsabilidade do Professor Doutor Silvio Sanches Veiga, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Foi mantida congelada a uma temperatura de -20°C e descongelada em temperatura ambiente no exato momento de sua utilização, a fim de preservar sua atividade, a qual é mensurada usando o “Amplex Red Assay Kit” (Molecular Probes, Eugene). Nesse teste a atividade da fosfolipase-D é monitorada através do uso de um reagente fluorogênico (*10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine*) sensível ao  $H_2O_2$ . Primeiro, a fosfolipase-D recombinante (LiRecDT1) hidroliza a esfingomielina gerando ceramida-fosfato e colina. A colina, então, é oxidada pela colina-oxidase em betaína e  $H_2O_2$ . Finalmente, o  $H_2O_2$  na presença de uma peroxidase, reage com o reagente fluorogênico gerando um produto altamente fluorescente, o *resorufin* indicando a atividade da toxina (CHAVES-MOREIRA et al., 2011c; KUSMA, 2008).



### 3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Foram realizados 5 protocolos experimentais. Destes, 3 foram realizados “*in vitro*” e 2 “*in situ*”. Para os protocolos experimentais realizados “*in vitro*” foram utilizadas preparações de nervo frênico-músculo diafragma para estimulação indireta (via nervo) e preparações de músculo diafragma e de solear para estimulação direta (via músculo). Para os protocolos experimentais realizados “*in situ*” foram utilizadas preparações de músculo gastrocnêmio e nervo ciático-músculo gastrocnêmio. Cada protocolo contou com uma amostra de 12 animais, subdivididos em dois grupos, um controle (n=6) e outro experimental (n=6). Para a realização dos protocolos 2, 3 e 4, descritos adiante, foram utilizados os mesmos animais.

Um protocolo avaliou o efeito direto da toxina no músculo. Nesse caso a toxina foi adicionada a solução nutritiva que banhava a preparação, numa concentração de 100 µg/ml. Tal concentração corresponde a aproximadamente 50 vezes o volume de veneno inoculado pela aranha marrom durante uma picada e é considerada elevada o suficiente para provocar a morte de camundongos num período menor que 24 horas (KUSMA, 2008). Os demais protocolos avaliaram os efeitos indiretos (sistêmicos) da toxina sobre o músculo. Para isso a toxina foi injetada no animal, via intraperitoneal, com 24 horas de antecedência. A concentração utilizada foi de 10 µg/kg, eleita com base em um estudo realizado por KUSMA (2008), que demonstrou uma DL<sub>50</sub> (dose letal para 50% da amostra) nas primeiras 16 horas, para a concentração de 50 µg/kg de LiRecDT1 em camundongos. Para determinar o tratamento a que os grupos controles seriam submetidos foram realizados testes preliminares usando tanto a toxina desnaturada quanto o veículo (Pbs) em que a toxina é diluída. Como não observou-se diferença entre os tratamentos nos parâmetros a serem avaliados, optou-se por fazer uso do Pbs, uma vez que a clonagem e expressão da LiRecDT1 a partir do veneno da aranha marrom é um processo complexo e que envolve tempo e disponibilidade de veneno.

O registro das contrações isométricas e os dados relacionados a geração de força, velocidade de contração (+df/dt) e velocidade de relaxamento (-df/dt)

foram coletados durante todo o período dos experimentos e digitalizados por um sistema de aquisição de dados (PowerLab, AD Instrument) conectado a um computador e analisados *a posteriori*.

Antes de cada experimento, foi realizada a curva de calibração do transdutor de força obtida com massas conhecidas (padrão). Para que a força produzida pelos músculos pudesse ser equiparada com a sua área de secção transversa, o diâmetro e/ou espessura, o comprimento e o peso da preparação foram mensurados. Então, a área de secção transversa das preparações foi determinada através da fórmula:

$$\text{Área} = \text{massa}/(\text{comprimento} \times \text{densidade}) - \text{Dado a densidade como } 1,06.$$

### 3.3.1 Protocolo 1: Preparação de nervo ciático-músculo gastrocnêmio – “*in situ*”

Os animais foram anestesiados com uretana (dose 1,8 µg/kg) e após a verificação de ausência de resposta a estímulos dolorosos o músculo gastrocnêmio e sua respectiva inervação (nervo ciático) foram expostos e adaptados ao eletroestimulador de acordo com a metodologia utilizada por Akaike e colaboradores, (2013) em músculos soleares de ratos. A extremidade tendínea distal (tendão calcâneo) foi desinserida do seu ponto de inserção óssea e conectada a um transdutor de força (WPI-Fort 10, *Transuction Laboratories Co.*) para mensuração das contrações em condições isométricas. Eletrodos de platina conectados a um estimulador foram posicionados sob o nervo ciático (via indireta) e estímulos elétricos de voltagem supralimiar (10-30 V), com pulso de 1ms de duração e frequência padrão de 0,5 Hz foram aplicados pelo período de 1 hora (Figura 5). Foi aguardado o tempo necessário para a estabilização da força, da velocidade de contração e de relaxamento do músculo (cerca de 10 minutos) sendo este, então, considerado o tempo zero (T0). A partir de então foi calculado a média da força de contração, velocidade de contração e velocidade de relaxamento desenvolvida a cada 10 minutos.

A superfície muscular e nervosa exposta permaneceu hidratada durante todo o período de experimento através do gotejamento intermitente de solução

nutritiva – Ringer - com a seguinte composição (em mM): NaCl= 110; KCl= 4,0; CaCl<sub>2</sub>= 2,0; MgCl<sub>2</sub>= 2,0; TRIZMA= 10 e glicose= 11, com pH= 7,4. Os animais foram mantidos vivos durante todo o período de experimento e o suprimento sanguíneo tanto para o músculo como para o nervo se manteve intacto, garantindo adequada nutrição e oxigenação da preparação. Nesses experimentos avaliou-se o efeito sistêmico (indireto) da toxina sobre o músculo e para tal, os animais receberam uma injeção prévia de toxina (via intraperitoneal) na concentração de 10 µg/kg, com 24 horas de antecedência.



**Figura 5.** Preparação de nervo ciático-músculo gastrocnêmio. A seta preta mostra o eletrodo posicionado sob o nervo ciático.

### 3.3.2 Protocolo 2: Preparação de músculo gastrocnêmio – “*in situ*”

O procedimento para a preparação de músculo gastrocnêmio se deu conforme o descrito no protocolo anterior, porém conforme ilustrado na Figura 6, o eletrodo foi posicionado diretamente sobre o músculo (via direta). Esses experimentos também avaliaram o efeito sistêmico (indireto) da toxina sobre o

músculo, portanto foi realizada a injeção prévia de 10 µg/kg de toxina (intraperitoneal) com 24 horas de antecedência. O tempo de estimulação foi de 1 hora, incluindo o tempo de estabilização (cerca de 10 minutos) obedecendo aos mesmos parâmetros do protocolo 1.

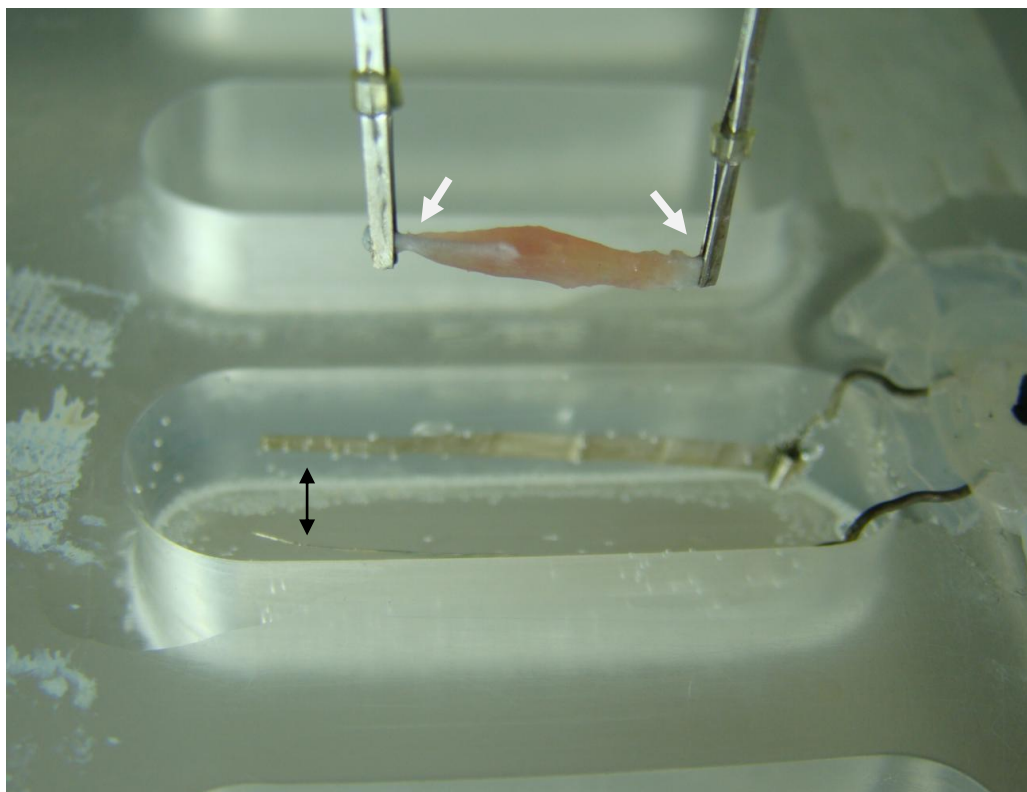


**Figura 6.** Preparação de músculo gastrocnêmio. A seta preta mostra o eletrodo posicionado diretamente sobre o músculo.

### 3.3.3 Protocolo 3 : Preparação de músculo solear – “*in vitro*”

Para a realização deste protocolo, os mesmos animais do protocolo anterior foram utilizados. O músculo solear foi dissecado e removido preservando as extremidades tendíneas que foram afixadas a um micromanipulador (para ajuste do comprimento) e a um transdutor de força, para a mensuração das contrações em condições isométricas (Figura 7.). A preparação foi mergulhada numa câmara

contendo solução nutritiva (composição conforme descrita no protocolo 1), mantida em temperatura ambiente e gaseificada com oxigênio puro durante todo o período de experimento. A preparação foi estimulada por 1 hora obedecendo aos mesmos parâmetros de frequência e voltagem dos protocolos anteriores, porém com duração do estímulo de 5 ms.

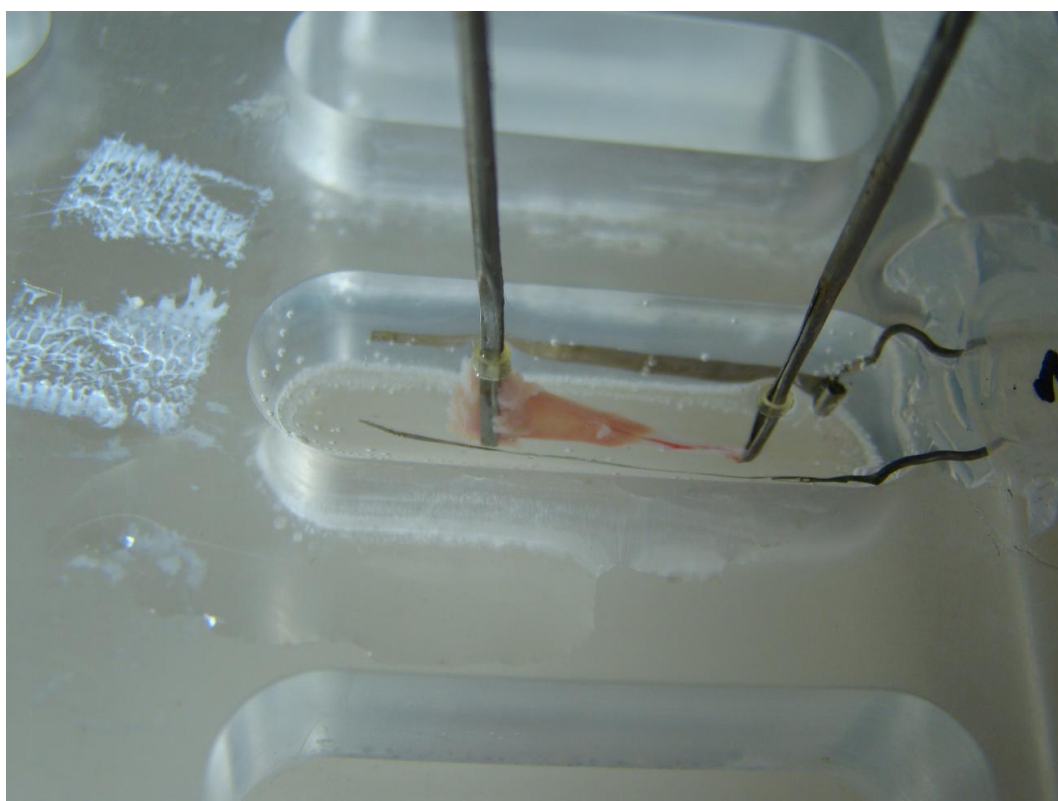


**Figura 7.** Preparação de músculo solear. As setas brancas mostram o músculo solear com suas extremidades tendíneas fixadas ao micromanipulador (seta da esquerda) e ao transdutor de força (seta da direita). A seta preta mostra os eletrodos de platina posicionados nas laterais da câmara onde o músculo permaneceu banhado em solução nutritiva durante todo o período do experimento.

#### 3.3.4 Protocolo 4 : Preparação de músculo diafragma – “*in vitro*”

Após a realização dos protocolos 2 e 3 os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e utilizados para a realização do protocolo 4. Para esse protocolo, o músculo diafragma foi removido via toracotomia, dissecado e mantido em solução de Ringer, gaseificada com oxigênio puro e em temperatura ambiente. Conforme Ferreira *et al.* (2010), a extremidade costal do diafragma foi afixada em

posição estacionária a um micromanipulador e a extremidade tendinosa foi conectada ao transdutor de força para mensuração das contrações em condições isométricas. A estimulação se deu de forma direta (via músculo), através de eletrodos de platina posicionados nas laterais da câmara na qual a preparação permaneceu banhada em solução nutritiva durante o período de experimento (Figura 8.) Nesses experimentos avaliou-se o efeito sistêmico (indireto) da toxina sobre o músculo. A preparação foi estimulada por um período de 1 hora, incluindo o tempo de estabilização (cerca de 10 minutos – T0) obedecendo aos seguintes parâmetros: 0,5 Hz de frequência, pulso de 1 ms de duração e voltagem supralimiar (10-30 V).



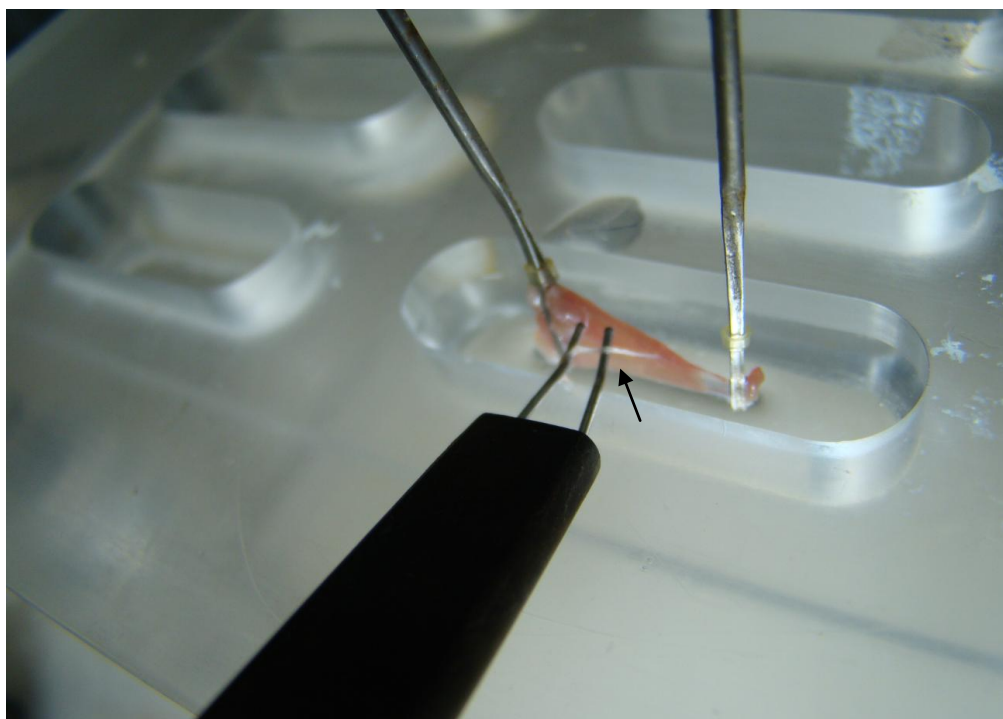
**Figura 8.** Preparação de músculo diafragma.

#### 3.3.5 Protocolo 5 : Preparação de nervo frênico-músculo diafragma – “*in vitro*”

Após a eutanásia dos animais por overdose de anestésico uretana (dose 10 g/kg) e após verificada a ausência de resposta a estímulos, o músculo diafragma



e sua respectiva inervação (nervo frênico) foram removidos via toracotomia, dissecados e mantidos em solução de Ringer, gaseificada com oxigênio puro, em temperatura ambiente. O procedimento de montagem, adaptado de Ferreira *et al.* (2010), se deu conforme o descrito no protocolo 4, porém a estimulação se deu de forma indireta. Para isso, o nervo frênico foi posicionado sobre eletrodos de platina conectados a um estimulador (Figura 9.) e estímulos elétricos de voltagem supralimiar (10-30 V), com pulso de 1ms de duração e frequência padrão de 0,5 Hz foram aplicados.



**Figura 9.** Preparação de nervo frênico-músculo diafragma. A seta preta mostra o eletrodo posicionado sob o nervo frênico.

A preparação foi estimulada por um período de 1 hora, incluindo o tempo de estabilização (cerca de 10 minutos – T<sub>0</sub>) na ausência da toxina. Em seguida, a toxina fosfolipase-D (LiRecDT1) foi adicionada à solução nutritiva na concentração de 100 µg/ml (para avaliar o efeito direto da toxina sobre a preparação). O nervo foi estimulado por mais 1 hora e 30 minutos, incluindo o tempo necessário para o músculo atingir o estado estacionário. A média da força de contração, velocidade de

contração e velocidade de relaxamento desenvolvida foi determinada a cada 20 minutos.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram utilizados os valores da média e EP (erro padrão) a partir dos dados obtidos dos parâmetros avaliados: força muscular, velocidade máxima de contração (+df/dt); e velocidade máxima de relaxamento (-df/dt), tanto em valores absolutos (g e g/s) como após normalização (%). O tamanho da amostra para a composição da média e do EP foi de 6 animais para o grupo controle e mais 6 animais para o grupo tratado em cada protocolo realizado. O teste t de Student foi empregado para comparação de um parâmetro no início e ao final do experimento tanto no grupo controle quanto no tratado. A análise de variância de uma via (One way – ANOVA) foi utilizada para a comparação do grupo tratado em relação ao controle e em todos os intervalos de tempo avaliados. Para análise dos dados foi utilizado o programa Sigma Plot versão 11.0 fabricado pela Jandel Scientific Inc. Foi aceita diferença estatisticamente significativa entre grupos, quando a probabilidade de ocorrência da hipótese nula foi inferior ou igual a 5 % ( $P \leq 0,05$ ).



## 4 RESULTADOS

### 4.1 PREPARAÇÕES NEURO-MUSCULARES

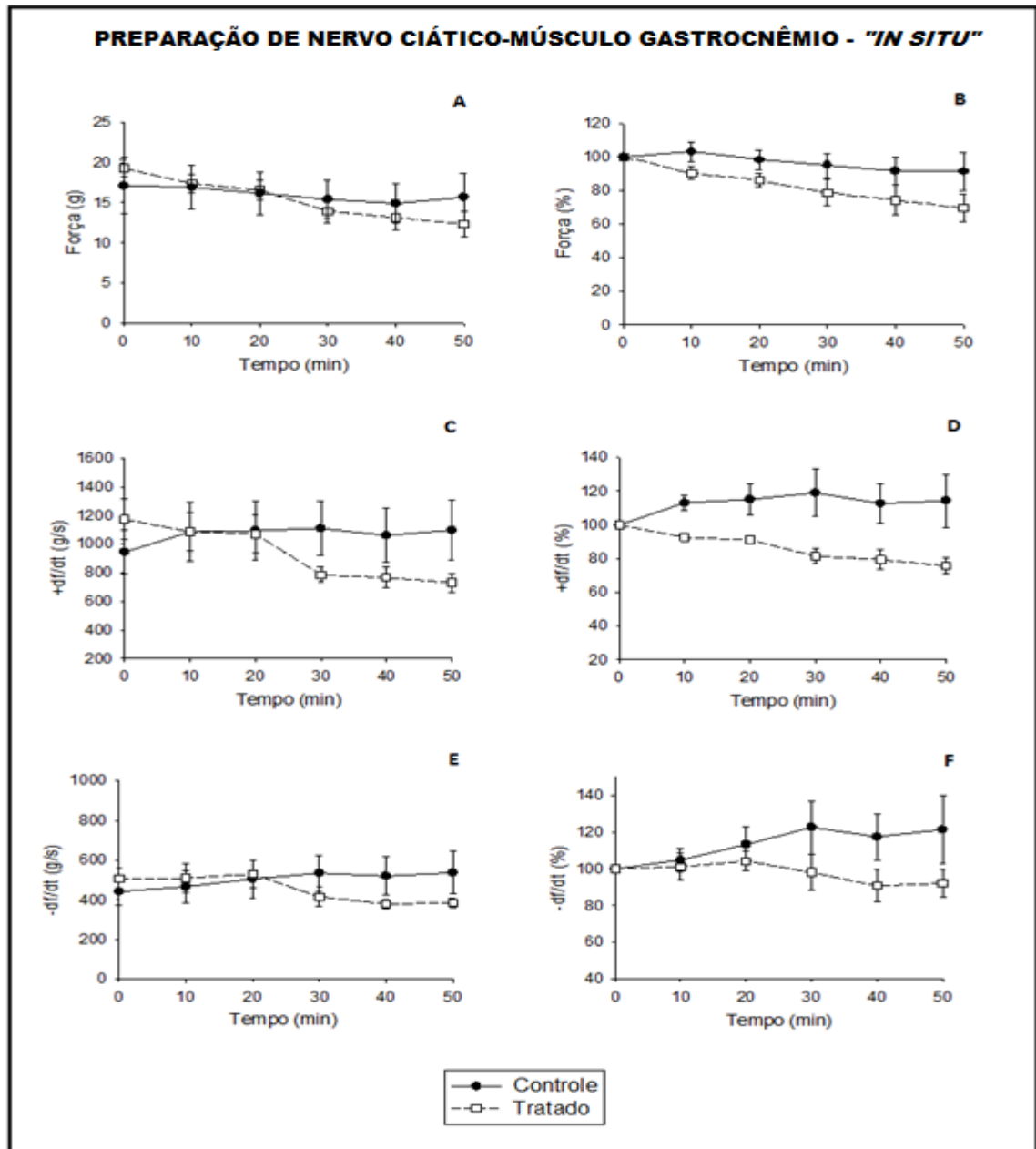
#### 4.1.1 Preparação de nervo ciático-músculo gastrocnêmio – “*in situ*”

Os resultados obtidos ao longo do tempo através da estimulação indireta do músculo gastrocnêmio de camundongos (via nervo ciático) “*in situ*”, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado com 10 µg/kg de LiRecDT1 via intraperitoneal com 24 horas de antecedência, estão representados na Figura 10. As letras A e B correspondem à força produzida em valores absolutos (g) e normalizados (%), respectivamente. A velocidade de contração (+df/dt) em valores absolutos (g/s) corresponde a letra C, e em valores normalizados (%) à letra D. A velocidade de relaxamento (-df/dt) em valores absolutos e normalizados está ilustrada nas letras E e F, respectivamente.

No grupo controle a média de força gerada, expressa em gramas (g) pelos músculos gastrocnêmios no tempo 0 (T0) foi de 17,08 g  $\pm$  3,5 e no tempo 50 (T50) foi de 15,68 g  $\pm$  2,9. No grupo tratado esse valor foi de 19,2 g  $\pm$  1,1 no T0 e de 12,3 g  $\pm$  1,5 no T50. Houve um declínio da força ao longo do tempo em ambos os grupos. No grupo controle a redução da força foi de 8,72% (P = 0.915) enquanto que no grupo tratado a redução foi de 30,5% (P = 0.007). Apesar dos dados demonstrarem uma tendência de redução da força muscular ao longo do tempo no grupo tratado com a LiRecDT1, quando comparado ao grupo controle essa redução não foi estatisticamente significativa em nenhum dos tempos comparados (P = 0.159).

A velocidade média de contração (+df/dt) desenvolvida no grupo controle foi de 943 g/s  $\pm$  156,1 no T0 e 1097 g/s  $\pm$  208,73 no T50. No grupo tratado a velocidade foi de 1172 g/s  $\pm$  138,93 e 729 g/s  $\pm$  63,1 no T0 e T50, respectivamente. Enquanto a velocidade de contração no grupo controle aumentou em 15% ao longo do tempo (P= 0.987), no grupo tratado houve um declínio de 24,3% (P= 0.06). Apesar de não significativo do ponto de vista estatístico esse dado

indica uma tendência de redução da velocidade de contração ao longo do tempo, como efeito da fosfolipase-D (LiRecDT1). Quando comparados, grupo controle e tratado, não observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $P = 0.584$ ).



**Figura 10. Gráficos - Preparação de nervo ciático-músculo gastrocnêmio "in situ".** Força muscular, velocidade de contração (+df/dt) e de relaxamento (-df/dt) desenvolvida pelo músculo gastrocnêmio previamente inoculado com 10µg/kg de LiRecDt1 (tratado) e PBS (controle) e eletroestimulado indiretamente (via nervo ciático) após 24 horas, por um período de 50 minutos. **(A)** Força muscular em valores absolutos e **(B)** normalizados; **(C)** +df/dt em valores absolutos e **(D)** normalizados; **(E)** -df/dt em valores absolutos e **(F)** normalizados. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

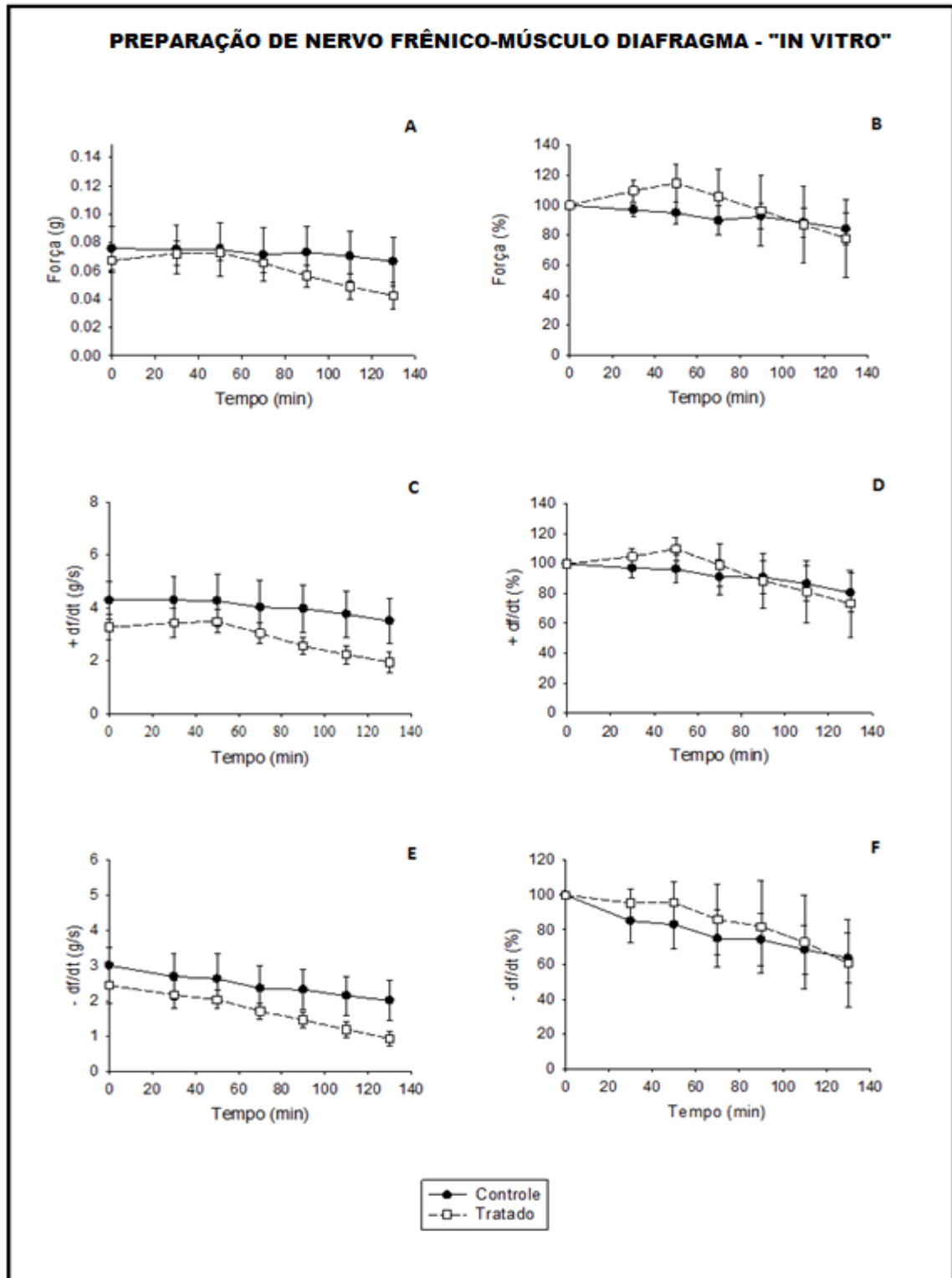
A velocidade média de relaxamento ( $-df/dt$ ) desenvolvida pelos músculos gastrocnêmios no grupo controle foi de 442 g/s  $\pm$  68,8 no T0 e 537 g/s  $\pm$  107,14 no T50. No grupo tratado a velocidade de relaxamento foi de 505 g/s  $\pm$  56,7 e 386 g/s  $\pm$  21,9 no T0 e T50, respectivamente. Enquanto a velocidade de relaxamento no grupo controle aumentou em 22% ao longo do tempo ( $P= 0.943$ ), no grupo tratado houve um declínio de 9,2% ( $P= 0.333$ ). Apesar disso, quando comparado entre os grupos, nos diferentes intervalos de tempos analisados, não houve diferença estatisticamente significativa ( $P = 0.940$ ).

#### 4.1.2 Preparação de nervo frênico-músculo diafragma – “*in vitro*”

Nesse protocolo foi avaliado o efeito direto da toxina sob o músculo esquelético e para tal, após 1 hora de estimulação da preparação banhada apenas em solução de Ringer, 100  $\mu$ g/ml da toxina LiRecDT1 foram adicionados à câmara no grupo tratado, enquanto o grupo controle recebeu o mesmo volume do veículo (Pbs) no qual a toxina é diluída.

Os resultados observados com a estimulação indireta do músculo diafragma de camundongos (via nervo frênico) “*in vitro*”, em função do tempo, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado estão representados na Figura 11. As letras A e B correspondem à força gerada em valores absolutos (g) e normalizados (%), respectivamente. As letras C e D correspondem à velocidade de contração ( $+df/dt$ ) e as letras E e F à velocidade de relaxamento ( $-df/dt$ ) desenvolvida e representadas em valores absolutos (g/s) e normalizados (%).

A força média gerada pelo músculo diafragma no grupo controle foi de 0,075 g  $\pm$  0,01 e 0,06 g  $\pm$  0,01, no T0 e T130, respectivamente. No grupo tratado, esses valores foram de 0,067 g  $\pm$  0,01 no T0 e 0,04 g  $\pm$  0,02 no T130. Houve um declínio da força ao longo do tempo em ambos os grupos, porém sem diferença significativa ( $P>0.05$ ). Também não houve diferença significativa entre os grupos ( $P>0.05$ ).



**Figura 11. Gráficos - Preparação de nervo frênico-músculo diafragma "in vitro".** Força muscular, velocidade de contração (+df/dt) e de relaxamento (-df/dt) desenvolvida pelo músculo diafragma sob ação direta de 100µg/ml de LiRecDt1 (tratado) e PBS (controle) e estimulado eletricamente (via nervo frênico) por um período de 130 minutos. **(A)** Força muscular em valores absolutos e **(B)** normalizados; **(C)** +df/dt em valores absolutos e **(D)** normalizados; **(E)** -df/dt em valores absolutos e **(F)** normalizados. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

A velocidade média de contração (+df/dt), expressa em valores absolutos, desenvolvida no grupo controle foi de 4,27 g/s  $\pm$  0,71 e 3,49 g/s  $\pm$  0,87, no T0 e T130, respectivamente. No grupo tratado, esses valores foram de 3,25 g/s  $\pm$  0,47 no T0 e 1,93 g/s  $\pm$  0,38 no T130. A velocidade média de relaxamento (-df/dt) desenvolvida no grupo controle foi de 3 g/s  $\pm$  0,5 no T0 e 2 g/s  $\pm$  0,5 no T130. No grupo tratado, esses valores foram de 2,4 g/s  $\pm$  0,5 e 0,9 g/s  $\pm$  0,2, no T0 e T130, respectivamente. Houve um declínio tanto da velocidade de contração como da velocidade de relaxamento em ambos os grupos ao longo do tempo porém, sem significância estatística ( $P > 0.05$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratado nos intervalos de tempo comparados ( $P > 0.05$ ).

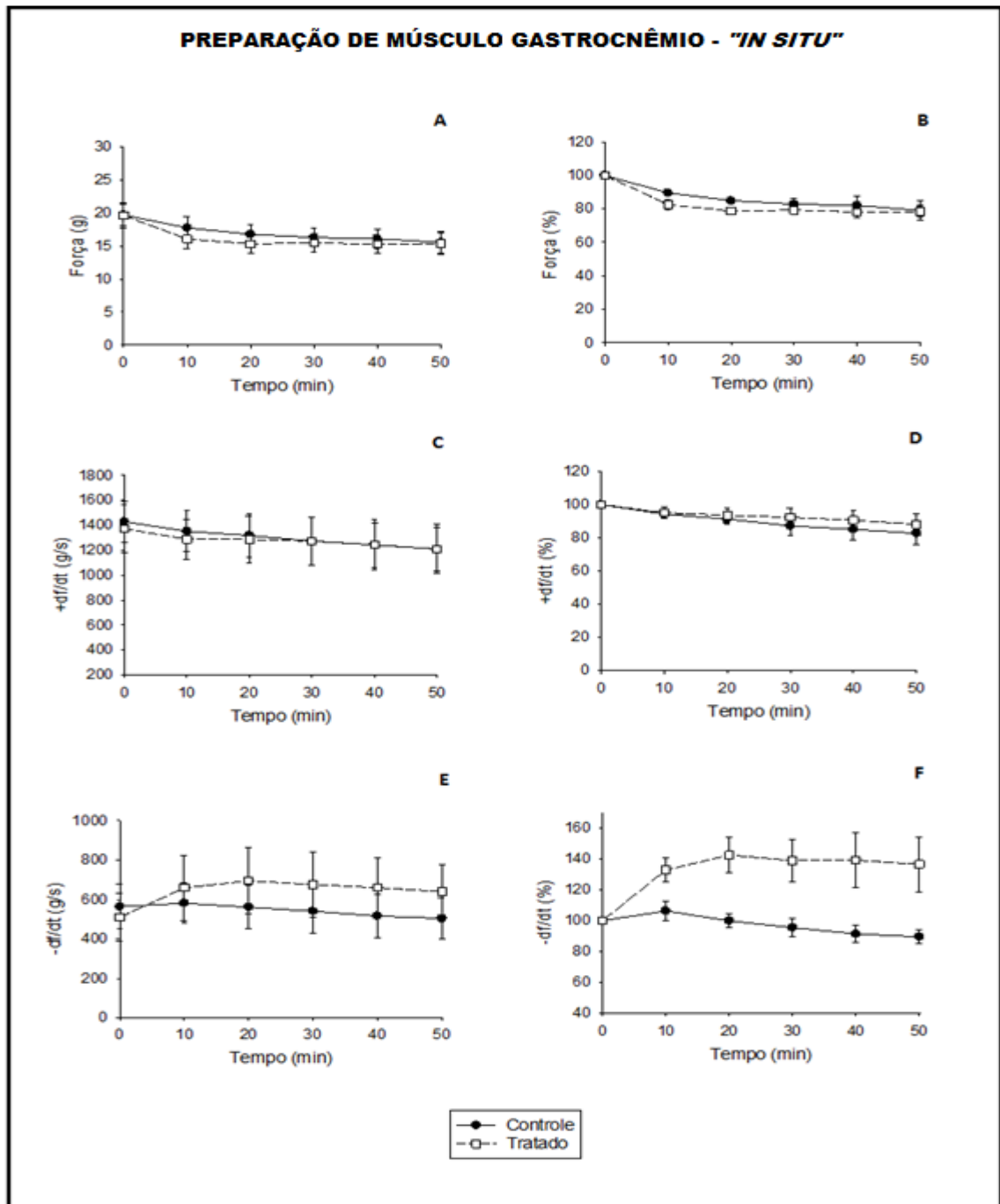
## 4.2 PREPARAÇÕES MUSCULARES

### 4.2.1 Preparação de músculo gastrocnêmio – “*in situ*”

Os resultados obtidos ao longo do tempo através da estimulação direta do músculo gastrocnêmio de camundongos “*in situ*”, tanto no grupo controle quanto no grupo tratado com 10  $\mu$ g/kg de LiRecDT1 via intraperitoneal com 24 horas de antecedência, estão representados na Figura 12. A média de força desenvolvida pelos músculos foi de 19,7 g  $\pm$  1,62 (T0) e 15,5 g  $\pm$  1,58 (T50) no grupo controle e 19,63 g  $\pm$  1,92 (T0) e 15,40 g  $\pm$  1,58 (T50) no grupo tratado (Figura 12 A e B). Tais dados demonstram que não houve diferença de força gerada ao longo do tempo nos grupos ( $P$  controle = 0.564 e  $P$  tratado = 0.315) e nem entre eles ( $P$  = 0.405), nos intervalos de tempo analisados.

A velocidade média de contração (+df/dt) expressa em valores absolutos (g/s) desenvolvida no grupo controle foi de 1429 g/s  $\pm$  166,6 no T0 e 1209 g/s  $\pm$  198 no T50. No grupo tratado a velocidade foi de 1373 g/s  $\pm$  192 e 1208 g/s  $\pm$  176, no T0 e T50, respectivamente (Figura 9 C e D). Em ambos os grupos a velocidade de contração diminuiu ao longo do tempo, porém de forma insignificante do ponto de vista estatístico ( $P > 0.05$ ). A diferença na velocidade de contração desenvolvida

ao longo do tempo entre os grupos também não foi estatisticamente significativa nos intervalos de tempo analisados ( $P > 0.05$ ).



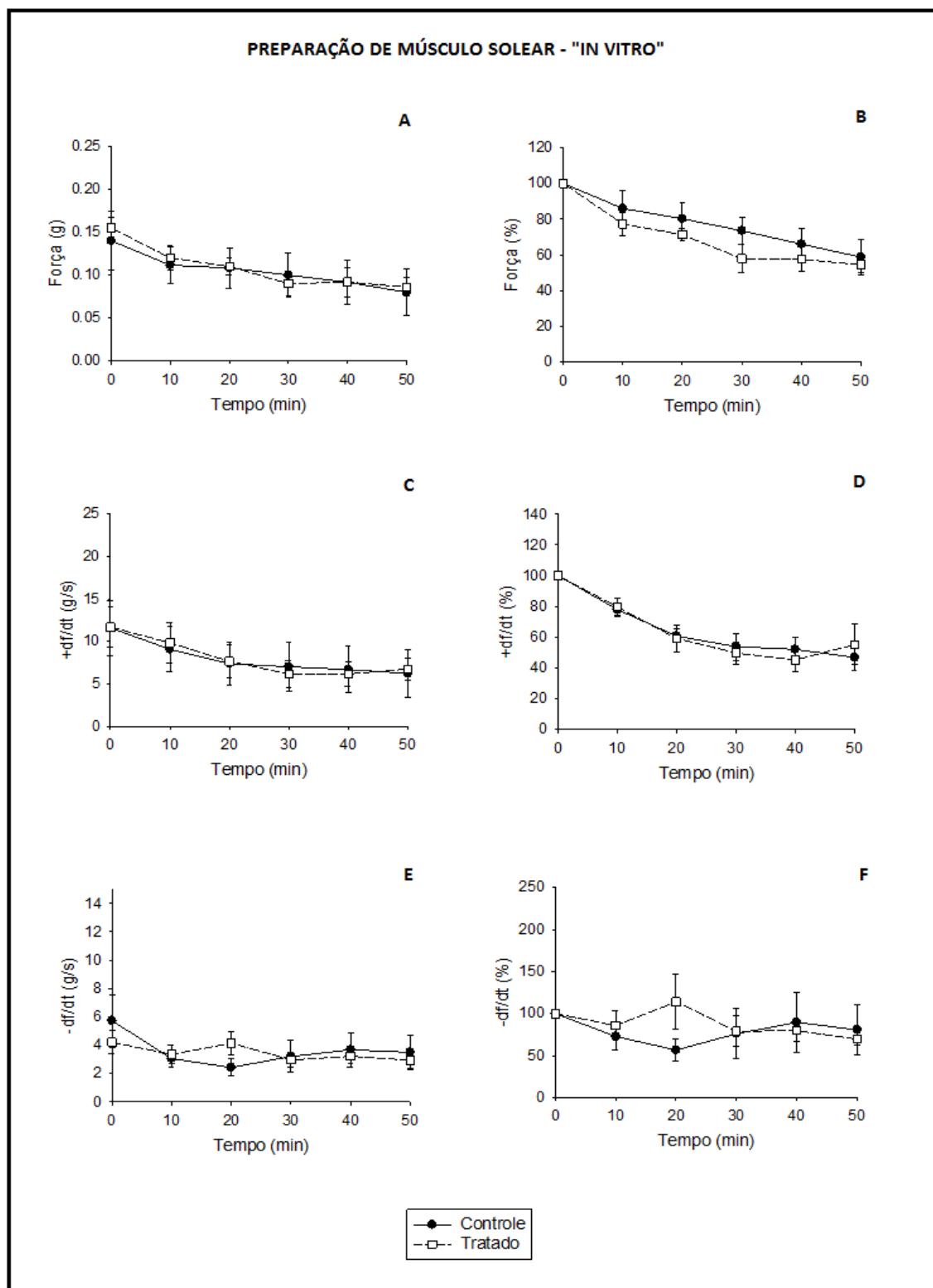
**Figura 12. Gráficos - Preparação de músculo gastrocnêmio "in situ".** Força muscular, velocidade de contração (+df/dt) e de relaxamento (-df/dt) desenvolvida pelo músculo gastrocnêmio previamente inoculado com 10µg/kg de LiRecDt1 (tratado) e PBS (controle) e eletroestimulado após 24 horas, por um período de 50 minutos. **(A)** Força muscular em valores absolutos e **(B)** normalizados; **(C)** +df/dt em valores absolutos e **(D)** normalizados; **(E)** -df/dt em valores absolutos e **(F)** normalizados. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

A velocidade média de relaxamento ( $-df/dt$ ) expressa em valores absolutos (g/s) (Figura 12 E) desenvolvida pelos músculos gastrocnêmios no grupo controle foi de 564 g/s  $\pm$  113 no T0 e de 503 g/s  $\pm$  104 no T50. No grupo tratado foi de 510 g/s  $\pm$  122 e 639 g/s  $\pm$  139, T0 e T50, respectivamente. Enquanto a velocidade de relaxamento no grupo controle diminuiu 10,5% ao longo do tempo ( $P = 0.957$ ), no grupo tratado houve um aumento de 42,47% ( $P = 0.963$ ) (Figura 12 F). Apesar dos dados demonstrarem uma tendência de aumento da velocidade de relaxamento ao longo do tempo no grupo tratado com a LiRecDT1, quando comparado ao grupo controle esse aumento não foi estatisticamente significativo em nenhum dos tempos comparados ( $P = 0.999$ ). Isso se deve ao fato de que no grupo tratado a velocidade de relaxamento inicialmente desenvolvida foi menor que a do grupo controle, havendo um aumento mais pronunciado entre os intervalos de tempo 0 e 10 e permanecendo praticamente inalterada nos intervalos de tempo subsequentes.

#### 4.2.2 Preparação de músculo solear “*in vitro*”

Os dados de força, velocidade de contração ( $+df/dt$ ) e velocidade de relaxamento ( $-df/dt$ ) obtidos ao longo do tempo pela estimulação direta “*in vitro*” do músculo solear de camundongos, tanto no grupo controle quanto no tratado com 10  $\mu$ g/kg de LiRecDT1 via intraperitoneal com 24 horas de antecedência, estão ilustrados na Figura 13.

Os valores absolutos (g) da força média gerada no T0 e T50 pelos músculos soleares do grupo controle foi de 0,14 g  $\pm$  0,03 e 0,08 g  $\pm$  0,02, respectivamente. No grupo tratado, esses valores foram de 0,15 g  $\pm$  0,01 no T0 e 0,08 g  $\pm$  0,01 no T50. Houve um declínio da força média gerada ao longo do tempo em ambos os grupos, porém não significativo do ponto de vista estatístico ( $P > 0.05$ ). Também não houve diferença estatística entre os grupos em nenhum dos intervalos de tempo comparados ( $P = 0.186$ ) (Figura 13 A e B).



**Figura 13. Gráficos - Preparação de músculo solear "in vitro".** Força muscular, velocidade de contração (+df/dt) e de relaxamento (-df/dt) desenvolvida pelo músculo solear isolado, previamente inoculado com 10µg/kg de LiRecDt1 (tratado) e PBS (controle) e eletroestimulado após 24 horas, por um período de 50 minutos. **(A)** Força muscular em valores absolutos e **(B)** normalizados; **(C)** +df/dt em valores absolutos e **(D)** normalizados; **(E)** -df/dt em valores absolutos e **(F)** normalizados. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

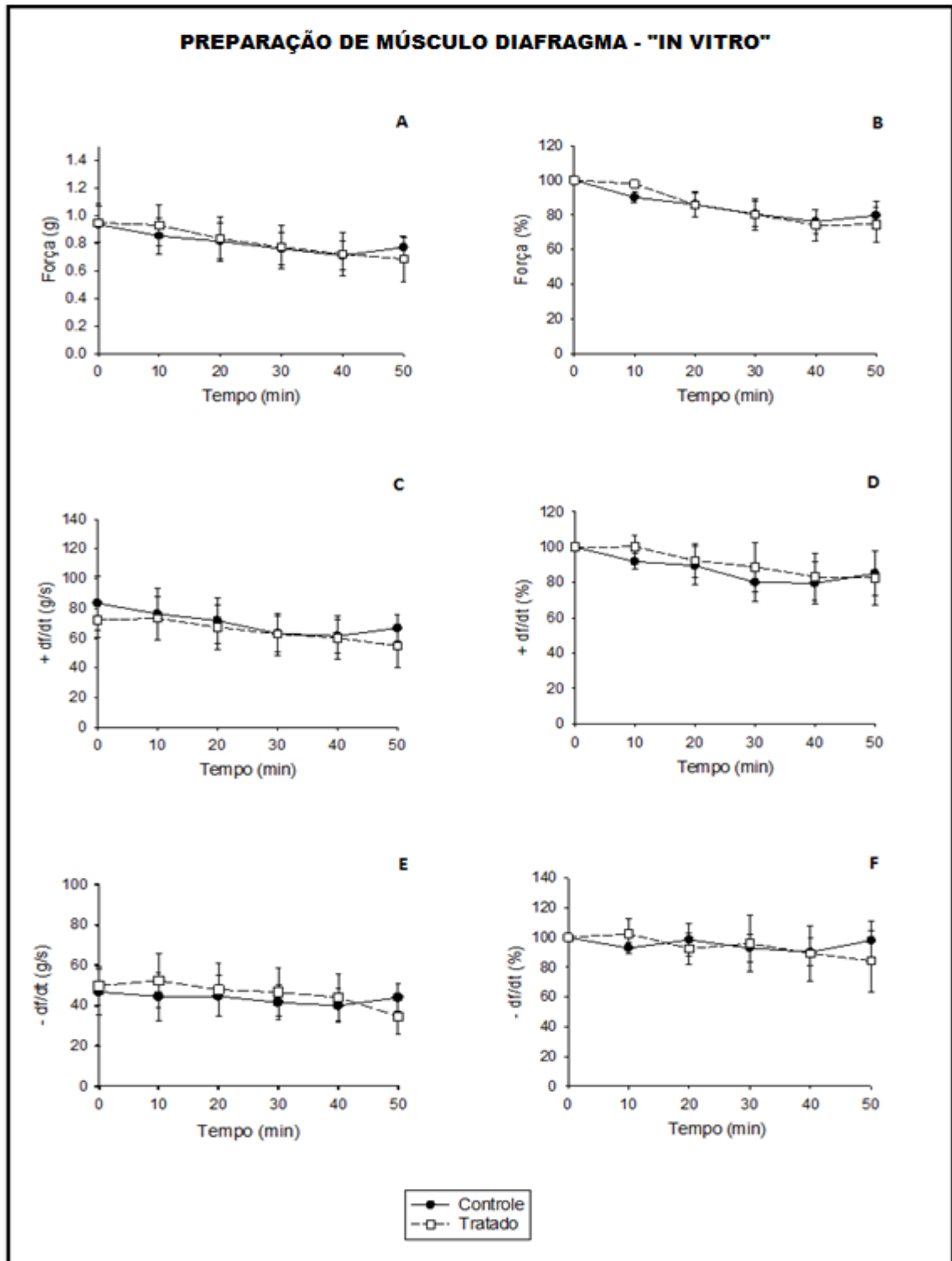


A velocidade média de contração desenvolvida no grupo controle foi de 11,58 g/s  $\pm$  3,2 no T0 e 6,21 g/s  $\pm$  2,8 no T50. No grupo tratado, esses valores foram de 11,66 g/s  $\pm$  2,3 e 6,74 g/s  $\pm$  1,24, no T0 e T50, respectivamente (Figura 13 C e D). A velocidade média de relaxamento desenvolvida no grupo controle foi de 5,73 g/s  $\pm$  1,85 no T0 e 3,5 g/s  $\pm$  1,22 no T50. No grupo tratado, esses valores foram de 4,21 g/s  $\pm$  0,79 e 2,94 g/s  $\pm$  0,55, no T0 e T50, respectivamente. Houve declínio tanto da velocidade de contração quanto da velocidade de relaxamento em ambos os grupos ao longo do tempo, porém sem diferença estatisticamente significativa nos grupos e entre eles ( $P > 0.05$ )

#### 4.2.3 Preparação de músculo diafragma – “*in vitro*”

Os dados de força, velocidade de contração (+df/dt) e velocidade de relaxamento (-df/dt) obtidos ao longo do tempo pela estimulação direta “*in vitro*” do músculo diafragma de camundongos, tanto no grupo controle quanto no tratado com 10  $\mu$ g/kg de LiRecDT1 via intraperitoneal com 24 horas de antecedência, estão ilustrados na Figura 14.

A força média gerada pelo músculo diafragma no grupo controle foi de 0,93 g  $\pm$  0,12 no T0 e 0,77 g  $\pm$  0,07 no T50. No grupo tratado, os valores foram de 0,95 g  $\pm$  0,14 no T0 e 0,68 g  $\pm$  0,16 no T50 (Figura 14 A). A velocidade média de contração desenvolvida grupo controle foi de 83,5 g/s  $\pm$  18,4 no T0 e 66,8 g/s  $\pm$  9,04 no T50. No grupo tratado esses valores foram de 72,3 g/s  $\pm$  11,8 e 54,8 g/s  $\pm$  14,5, no T0 e T50, respectivamente (Figura 14 C). A velocidade de relaxamento média desenvolvida no grupo controle foi de 46,8 g/s  $\pm$  11,4 e 44 g/s  $\pm$  6,6 no T0 e T50, respectivamente. No grupo tratado, esses valores foram de 49,8 g/s  $\pm$  9,6 no T0 e 34,6 g/s  $\pm$  8,8 no T50 (Figura 14 E). Houve um declínio dos valores ao longo do tempo em todos os parâmetros avaliados em ambos os grupos, porém sem diferença estatisticamente significativa ( $P > 0.05$ ). Também não houve diferença significativa entre os grupos nos intervalos de tempo comparados ( $P > 0.05$ ).



**Figura 14. Gráficos - Preparação de músculo diafragma "in vitro".** Força muscular, velocidade de contração (+df/dt) e de relaxamento (-df/dt) desenvolvida pelo músculo diafragma isolado, previamente inoculado com 10µg/kg de LiRecDt1 (tratado) e PBS (controle) e eletroestimulado após 24 horas, por um período de 50 minutos. **(A)** Força muscular em valores absolutos e **(B)** normalizados; **(C)** +df/dt em valores absolutos e **(D)** normalizados; **(E)** -df/dt em valores absolutos e **(F)** normalizados. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a LiRecDt 1 não promoveu efeitos deletérios importantes em preparações neuro-musculares de camundongos tanto em condições “*in situ*” quanto isoladas. Tanto os protocolos experimentais que avaliaram o efeito da toxina sobre a transmissão nervosa (preparações neuromusculares) como os que avaliaram seus efeitos diretamente no músculo não revelaram alterações significativas do ponto de vista estatístico nos parâmetros analisados. Isso nos leva a refutar nossa hipótese inicial de que a função muscular e a transmissão neuromuscular seriam comprometidas pela ação da toxina. Nossos achados apenas indicaram uma tendência de diminuição ao longo do tempo, tanto da força muscular, como da velocidade de contração e de relaxamento nos músculos esqueléticos tratados com a LiRecDT1. Esses achados foram mais evidentes no protocolo experimental que avaliou os efeitos sistêmicos (indiretos) da toxina em preparações neuromusculares (nervo ciático-músculo gastrocnêmio) de animais previamente inoculados com a toxina. Também não foram observados alterações nos parâmetros de contratilidade de preparações neuromusculares e de músculo isolado expostos diretamente à toxina.

Em preparações “*in situ*” o número de interferências externas diminui uma vez que com o animal sendo mantido vivo durante o período de experimento, o suprimento sanguíneo para o músculo é preservado, garantindo adequada nutrição e oxigenação e permitindo um período maior de experimentação (CROES, VON BARTHELD, 2007). Em contrapartida, nesse tipo de experimento, não é possível eliminar as ações sistêmicas da LiRecDT1 (sobre os sistemas circulatório, cardíaco e renal, por exemplo), que podem alterar a função muscular indiretamente. Sendo assim, não é possível afirmar que essa discreta alteração dos parâmetros de contratilidade muscular encontrada em nossos experimentos “*in situ*” seja decorrente do efeito direto da toxina sobre o músculo, podendo ser atribuída à alterações secundárias decorrentes do envolvimento de outros órgãos ou sistemas. Resultados similares foram encontrados em estudo realizado por Peixoto (2013), em músculos cardíacos e lisos de ratos submetidos à LiRecDT1. Nesse, a administração intraperitoneal de LiRecDt1 reduziu o valor máximo da pressão intraventricular e a velocidade máxima de relaxamento porém, não foram observados

efeitos diretos da toxina em parâmetros de contratilidade de músculos papilares isolados e anéis de aorta. Assim como no nosso estudo, esses dados sugerem que o efeito deletério causado pela fosfolipase-D no músculo foi decorrente de alterações sistêmicas que comprometeram de maneira indireta a função muscular.

Já os experimentos “*in vitro*” não estão submetidos às influências do meio interno. Contudo, as preparações isoladas apresentam maiores distâncias de difusão, obrigando o pesquisador utilizar recortes de músculos ou músculos com menores áreas de secção transversa e por um tempo menor de experimentação. Nos nossos experimentos, utilizamos músculos soleares cuja área de secção transversa é menor e também recortes de músculo diafragma minimizando assim este fator limitante. A principal vantagem dos experimentos “*in vitro*” é a possibilidade de eliminação dos efeitos sistêmicos e de qualquer interferência de outros órgãos ou sistemas. Isso permite avaliar o efeito direto da toxina sobre o músculo e serve como uma espécie de “contra-prova” dos achados nos experimentos “*in situ*” (FERREIRA *et al.*, 2010). O protocolo número 5 do nosso estudo (preparação de nervo frênico – músculo diafragma) foi realizado justamente com esse objetivo e para isso a toxina foi adicionada diretamente na câmara onde a preparação permaneceu banhada em uma concentração de 100 µg/ml. Como esperado, os resultados obtidos corroboram àqueles obtidos “*in situ*”: a toxina não interferiu de forma significativa na função muscular esquelética, apenas indicando uma tendência de redução dos parâmetros avaliados ao longo do tempo.

Vários estudos demonstram que a fosfolipase-D é uma enzima que promove a hidrólise dos fosfolipídios da membrana (LAJOIE *et al.*, 2013; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011c; KUSMA, 2008). Wille *et al.* (2013), demonstrou que a esfingomielina e a lisofosfatidilcolina são os substratos preferenciais da fosfolipase-D e que a esfingomielina é hidrolisada mais rapidamente e com mais eficiência que os demais fosfolipídios da membrana. Segundo Nikolova-Karakashian e Reid (2011), os músculos esqueléticos são muito ativos na síntese de esfingolipídios. Análises comparativas da atividade da enzima que dá início a biosíntese dos esfingolipídios - serina palmitoiltransferase (SPT) – “de novo síntese”, em microssomos isolados de vários tecidos de ratos, demonstraram que os microssomos dos músculos esqueléticos exibem o segundo mais alto nível de atividade SPT, perdendo apenas

para os pulmões. Wille *et al.* (2013), também observou-se que os mais altos níveis de hidrólise dos fosfolipídios da membrana ocorrem após 30 minutos de exposição à LiRecDT1 e que esse nível se mantém elevado por 24 horas. Sendo assim, era de se esperar que, se a toxina fosse comprometer algum parâmetro da função muscular, isso seria demonstrado em nosso estudo, pois as preparações isoladas foram avaliadas durante um período de 50 a 130 minutos e os experimentos com preparações neuromusculares ou de músculo “in situ” foram realizados 24 horas após a inoculação com a LiRecDT1 por via intra peritoneal.

Como os produtos da hidrólise dos fosfolipídios (ceramida, ácido fosfatídico e ácido lisofosfatídico, principalmente) geram segundos mensageiros (diacilglicerol (DAG) e/ou ácido lisofosfatídico, ceramida-1-fosfato, esfingosina e esfingosina-1-fosfato) que, via proteínas-G, ativação de proteínas cinases-C (PKC) e aumento da concentração de cálcio intracelular podem modular uma variedade de eventos biológicos e desencadear efeitos deletérios às células que vão desde respostas inflamatórias agudas, hemólise, agregação plaquetária, aumento da permeabilidade vascular, alterações vasculares e dermonecrose, nós esperávamos que essas alterações a nível celular fossem comprometer a função muscular mesmo que indiretamente, ou seja, decorrente de alterações sistêmicas (WILLE, *et al.*, 2013; ABE, KOBAYASHI, 2013; LAJOIE *et al.*, 2013; CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011c; ULLAH, 2011; KUSMA, 2008).

Estudos realizados por Lamb e colaboradores (1994), e reproduzidos por Chin e Allen (1996), demonstraram que o aumento nas concentrações de cálcio para níveis próximos a 1mM  $\text{Ca}^{2+}$  pode abolir o acoplamento excitação-contração e resultar em alterações na estrutura da junção túbulos-T/retículo sarcoplasmático (tríade) comprometendo a função muscular. Acredita-se que os incrementos no nível de cálcio podem ativar proteases específicas – calpainas - conhecidas por serem ativadas após o exercício (BELCASTRO, 1993) e causar a hidrólise dos canais liberadores de cálcio *in vitro* (GILCHRIST *et al.*, 1992). Apesar de, em nosso estudo, não termos quantificado os níveis de cálcio intracelular, o que abre possibilidades para novos estudos, acreditamos que a elevação da concentração citoplasmática de cálcio por ação da LiRecDT1 não tenha sido suficiente para ativar

essas proteases e comprometer de forma significativa o processo de transmissão neuro muscular e/ou o acoplamento excitação-contração.

A atividade esfingomielinásica está aumentada durante a resposta inflamatória sistêmica (*sepsis*) (FERREIRA *et al.*, 2010) e é causa comum de disfunção contrátil, levando à perda de força muscular e predispondo à fadiga (JIAO *et al.*, 2013). Em estudo realizado com músculo diafragma de ratos verificou-se que a *sepsis* induzida por fármacos levou à diminuição significativa dos níveis de expressão dos receptores diidropiridínicos (DHPR $\alpha$ 1s) e dos receptores de rianodina (RyR1) do RS, ambos presentes nos músculos esqueléticos. Essa diminuição, segundo os autores, pode ser um dos fatores responsáveis pela redução da força dos músculos respiratórios e pelo quadro de fadiga muscular encontrado nos indivíduos com *sepsis* (JIAO *et al.*, 2013). Quadros inflamatórios também levam ao aumento da temperatura corporal, aumento da permeabilidade vascular e redução do pH celular (JIAO *et al.*, 2013). No músculo esquelético a acidificação do meio pode comprometer a função muscular por reduzir o número de pontes cruzadas com ligações fortes em fibras musculares fásicas (tipo II – rápidas) e a força com que as pontes cruzadas ciclam em ambos os tipos de fibras musculares. Além disso, o aumento da temperatura corporal pode potencializar esse efeito inibitório gerado pela queda do pH (FITTS, 2008).

Segundo Ferreira e colaboradores (2010 e 2012), a ceramida, produto intracelular da atividade esfingomielinásica prejudica a captação muscular de glicose, interrompe a fosforilação oxidativa mitocondrial e estimula a produção de derivados celulares oxidantes. O acúmulo de espécies reativas ao oxigênio (ROS) - peróxido de hidrogênio, o superóxido e os radicais de hidroxila - é mais uma das causas da acidificação do meio e do comprometimento funcional nos músculos (FERREIRA *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2010; CALLAHAN *et al.*, 2001). Segundo Bing (1997), o cálcio regula tanto a velocidade como a fração de filamentos contráteis que se movem (BING, 1997) e a sinalização oxidante pode alterar a sensibilidade do aparato contrátil ao cálcio (FERREIRA *et al.*, 2010). Consequentemente um menor número de pontes cruzadas se forma resultando em fraqueza muscular durante a eletroestimulação (FERREIRA *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2010).

No nosso estudo, utilizamos tanto músculos com predominância de fibras fásicas (solear) quanto músculos mistos (gastrocnêmio e diafragma) com a presença de ambos os tipos de fibras musculares. Esses músculos foram testados em experimentos que avaliaram tanto os efeitos diretos como sistêmicos da toxina e após 24 horas da intoxicação, tempo considerado suficiente para desencadear o processo inflamatório e consequentemente, promover o acúmulo de ROS, levar à alterações de pH e da temperatura corporal (JIAO *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2010; FITTS, 2008; CALLAHAN *et al.*, 2001). Apesar disso, não observamos diferença nos parâmetros de função muscular avaliados, independente da característica de cada tipo muscular. Isso nos leva a pensar que mesmo que a concentração de LiRecDT1 utilizada em nosso estudo tenha sido alta o suficiente para hidrolisar grande parte dos fosfolipídios da membrana, ainda assim, a quantidade de substrato gerado pode não ter sido suficiente para estimular a geração de derivados celulares oxidantes, alterar o pH celular, comprometer a expressão de receptores envolvidos no processo de contração muscular e diminuir a sensibilidade do aparelho contrátil ao cálcio a ponto de comprometer a função muscular.

Sabe-se que camundongos são bastante sensíveis à toxina dermonecrótica e que sua letalidade é atribuída à presença de tal toxina no veneno da aranha-marrom. Segundo Kusma (2008), 50 µg/kg de LiRecDT1 são suficientes para causar a morte de camundongos em menos de 24 horas. Apesar da alta letalidade, o veneno da *L.intermedia* não é capaz de degradar, fragmentar e romper a estrutura da membrana celular em camundongos, diferente do observado em humanos, porcos e coelhos. Estudos histopatológicos em músculos esqueléticos de coelhos, por exemplo, mostraram varias regiões marcadas por infiltração de leucócitos e neutrófilos, edema muscular e mionecrose de várias miofibrilas, mas esse efeito não se reproduz em ratos e camundongos (da SILVA *et al.*, 2004; OSPEDAL *et al.*, 2002). Wille *et al.* (2013), observou em cultura de células fantasmas B16-F10 submetidas à LiRecDT1 que elas não exibiram nenhuma alteração da viabilidade e não sofreram qualquer tipo de modificação morfológica, lise ou dano celular, mesmo com concentrações elevadas de LiRecDT1 (100, 200 e 300 µg/ml por 24, 48 e 72 horas). Já Chaves-Moreira (2011c), ao estudar os efeitos dessa mesma toxina em eritrócitos humanos observou que ela foi capaz de gerar

hemólise e que a hemólise foi proporcional ao aumento de cálcio intracelular. Tais achados nos induzem a pensar que não só alguns modelos animais, como também alguns tipos celulares específicos estão mais sujeitos aos efeitos deletérios da fosfolipase-D.

Apesar da maior parte dos efeitos deletérios decorrentes da picada da aranha-marrom ser atribuída a presença da fosfolipase-D no veneno, vários autores relatam que a atividade sinérgica dos componentes é responsável pela potencialização do seu efeito (da SILVA *et al.*, 2004; CHAVES-MOREIRA, 2011a; CHAIM *et al.*, 2011a; SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2008). Um exemplo disso é o estudo realizado por Christoff e colaboradores (2008), que comparou os efeitos do veneno bruto e da toxina isolada (LiRecDt1) sobre a função hepática. Neste, ratos Wistar receberam injeções subcutâneas tanto do veneno bruto (80 µg) como da LiRecDt1 (80 µg) e foram avaliados após 6 e 12 horas. No grupo submetido à toxina as alterações histológicas foram mais discretas e o metabolismo hepático foi modificado apenas no grupo que recebeu o veneno bruto. Estes resultados mostram que o veneno é hepatotóxico e que a toxina dermonecrótica é apenas parcialmente responsável por tal efeito (CHRISTOFF *et al.*, 2008).

Essa sinergia entre os componentes do veneno também pôde ser verificada em um estudo realizado por Dias-Lopes (2010), em músculo cardíaco de camundongos onde se observou um decréscimo da contratilidade cardíaca a qual foi mais pronunciada com a administração do veneno bruto, quando comparado a administração da toxina isolada. Segundo os autores isso se deve à presença de outros componentes tóxicos do veneno agindo de forma sinérgica, por exemplo, a hialuronidase (DIAS-LOPES *et al.*, 2010). Isso nos leva a pensar que em músculos esqueléticos essa sinergia também seria imperativa uma vez que ambos os tipos musculares possuem, salvo algumas particularidades, mecanismos contráteis bastante similares.

Nos nossos experimentos “*in situ*”, a eleição de 10 µg/kg de LiRecDT1 foi baseada na DL<sub>50</sub> (em 16 horas) de 50 µg/kg, demonstrada por Kusma (2008), em camundongos. Optamos pelo uso de 1/5 dessa concentração por julgarmos ser essa uma concentração segura, uma vez que as avaliações foram feitas após 24 horas de administração e com os animais mantidos vivos. Nos experimentos “*in vitro*” que



avaliaram os efeitos diretos da toxina sobre o músculo, optamos pelo uso de 100 µg/ml de LiRecDT1 uma concentração, segundo Kusma (2008), bem acima do inoculado pela aranha-marrom em uma picada, justamente visando compensar as condições de difusão geradas por esse tipo de experimentação. Como estudos avaliando os efeitos tanto da LiRecDT1 como do veneno bruto das *Loxosceles* na musculatura esquelética são escassos, as concentrações de toxina utilizadas em nossos experimentos se basearam em dados da literatura referentes aos efeitos desta em outros tipos celulares. O único estudo encontrado na literatura existente sobre o assunto (Ospedal, 2002) traz dados histológicos de vários tipos celulares, incluindo miócitos de coelhos, decorrentes da administração intradérmica do veneno, não servindo, então, como base para determinação da concentração da toxina a ser utilizada em nossos estudos. Sendo assim, apesar de todas as evidências encontradas de que a toxina não compromete significativamente a função muscular esquelética, não há como afirmar que as concentrações utilizadas em nossos estudos tenham sido as mais adequadas.

Finalizando, o estudo realizado por Dias-Lopes (2010), demonstrou que após 30 minutos de administração, as mais altas concentrações do veneno foram detectadas nos rins, seguida do coração, pulmões e fígado. De posse desse e de todos os dados encontrados na literatura e citados no presente estudo, além dos resultados provenientes dos nossos experimentos, fica claro que as repercussões em outros órgãos e sistemas, renal principalmente, decorrentes da ação da fosfolipase-D presente no veneno da *Loxosceles* são de maior importância clínica e, portanto, devem ser tomadas como prioridade em termos de intervenção terapêutica. E que os possíveis efeitos danosos ao músculo ficariam restritos aos desenvolvidos no local da picada, porém sem comprometer a transmissão neuromuscular e a função muscular de forma generalizada.

## 6 CONCLUSÃO

Apesar de estudos prévios demonstrarem que a fosfolipase-D presente no veneno da aranha-marrom é a toxina responsável pela maior parte dos efeitos deletérios decorrentes do envenenamento, pouco se sabe sobre seus efeitos na musculatura esquelética. Nosso estudo apontou para uma tendência de diminuição da força muscular, da velocidade de contração e de relaxamento no músculo esquelético de camundongos, porém sem comprometimento da transmissão neuromuscular e da função muscular de forma significativa o que sugere que no tecido muscular as repercussões são mínimas.

Como nossos experimentos foram realizados num modelo animal bastante sensível à toxina, mas que não desenvolve dermonecrose, não há como afirmar que nossos achados se reproduziriam em todas as espécies de mamíferos. Também, como o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da toxina sobre a função muscular através da análise de parâmetros de contratilidade via eletroestimulação, sem quantificar nível de cálcio intracelular, de ROS e de expressão de receptores relacionados à função contrátil, fica aberta a possibilidade para novas e mais aprofundadas investigações.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, M.; KOBAYASHI, T. Imaging local sphingomyelin-rich domains in the plasma membrane using specific probes and advanced microscopy. **Biochimica et Biophysica Acta** , 2013.
- AIHARA, T.; NAKAMURA, M.; UEKI, S.; HARA, H.; MIKI, M.; ARATA, T. Switch Action of Troponin on Muscle Thin Filament as Revealed by Spin Labeling and Pulsed EPR. **The Journal of Biological Chemistry**, 285(14): 10671–10677, 2010.
- AIRES, MARGARIDA DE MELLO. **Fisiologia**, 3º. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- AKAIKE, N.; SHIN, MIN-CHUL.; WAKITA, M.; TORII, Y.; HARAKAWA, T.; GINNAGA, A.; KATO, K.; KAJI, R.; KOZAKI, S. Transsynaptic inhibition of spinal transmission by A2 botulinum toxin. **J Physiol.**, 591(4): 1031–1043, 2013.
- ALBERTS; BRUCE et al., **Molecular biology of the cell**, 3rd ed., New York: Garland Publishing, Inc., 2008.
- ARAÚJO, D. A. M.; CORDEIRO, M. N.; DINIZ, C. R.; BEIRÃO, S. L. Effects of a toxic fraction, PhTx-2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. **Naunyn-Schmeidebergs Arch, Pharmacol.**, 1347, 1993.
- BABCOCK, J. L.; SUBER, R. L.; FRITH, C. H.; GEREN, C. R. Systemic effect in mice of venom apparatus extract and toxin from the brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*). **Toxicon**, 19, 1981.
- BAKER, M.; BOSTOCK, H.; GRAFE, P.; MARTIUS, P. Function and distribution of three types of rectifying channel in rat spinal root myelinated axons. **J. Physiol.**, 383: 45-67, 1987.
- BARBARO, K. C.; KNYSACK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**, 45(4):489-99, 2005.
- BEARD, N. A.; WEI, L.; DULHUNTY, A. F.  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in striated muscle: The elusive roles of triadin, junctin and calsequestrin. **Eur Biophys J.**, 39: 27-36, 2009.

BELCASTRO, A. N. Skeletal muscle calcium-activated neutral protease (calpain) with exercise. **Journal of Applied Physiology**, 74: 1381-1386, 1993.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. *et al.*, **Fisiologia**, 5<sup>o</sup>. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

BERS, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, 415:198-205, 2002.

BING, W.; FRASER, D. C.; MARSTON, S. B. Troponin I and troponin T interact with troponin C to produce different  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent effects on actin-tropomyosin filament motility. **Biochem. J.**, 327: 335-340, 1997.

BLUHM, W. F.; KRANIAS, E. G.; DILLMANN, W.H.; MEYER, M. Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 278(1): 249-55, 2000.

CALLAHAN, L. A.; SHE, Z. W.; NOSEK, T. M. Superoxide, hydroxyl radical, and hydrogen peroxide effects on single-diaphragm fiber contractile apparatus. **J Appl Physiol.**, 90: 45-54, 2001.

CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; DA SILVEIRA, R.B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VON DIETRICH, C. P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 211: 64 – 77, 2006.

CHAIM, O.M.; DA SILVEIRA, R.B.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V.P.; SADE, Y.B.; BOIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L.H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; TAKAHASHI, H.K.; TOLEDO, M.S.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by Brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochim Biophys Acta**, 1811: 84-96, 2011a.

CHAIM, O. M.; TREVISAN-SILVA, D.; CHAVES- MOREIRA, D. *et al.* Brown Spider (*Loxosceles genus*) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. **Toxins**, 3: 309-344, 2011b.

CHANG, C. C.; CHUANG, S. T.; LEE, C. Y.; WEI, J. W. Role of cardiotoxin and phospholipase A in the blockade of nerve conduction and depolarization of skeletal muscle induced by cobra venom. **Br. J. Pharmac.**, 44: 752-764, 1972.

CHAVES-MOREIRA, D. **Caracterização bioquímica e biológica de fosfolipases presentes em veneno de *Loxosceles intermedia* e *Lonomia obliqua***. 206f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011a.

CHAVES-MOREIRA, D.; ALVARENGA, L. M.; MUZZI, J. C. D.; DE MOURA, J.; VEIGA, S. S. Hemolytic activity of toxins from venomous animals: an overview. **Toxicon**, 2011b.

CHAVES-MOREIRA, D.; SOUZA, F. N.; FOGAÇA, R. T. H.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by Brown spider venom phospholipase-D toxin. **J Cell Biochem.**, 112:2529-2540, 2011c.

CHIN, E. R.; ALLEN, D. G. The role of elevations in intracellular  $[Ca^{2+}]$  in the development of low frequency fatigue in mouse single muscle fibers. **Journal of Physiology**, 491(3):813-824, 1996.

CHRISTOFF, A. de O.; de OLIVEIRA, A.; CHAIM, O. M.; LUGARINI, D.; PEREIRA, A. L. B.; PALUDO, K. S.; TELLES, J. E. Q.; BRACHT, A.; VEIGA, S. S.; ACCO, A. Effects of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. **Toxicon**, 52: 695–704, 2008.

COSTANZO, LINDA S., **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

COSTANZO, LINDA S., **Fisiologia**, 4<sup>o</sup>. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

CROES, S. A.; VON BARTHELD, C. S. Measurement of contractile force of skeletal and extraocular muscles: effects of blood supply, muscle size and in situ or in vitro preparation. **J Neurosci Methods**, 166(1): 53–65, 2007.

da SILVA, P. H.; da SILVEIRA, R. B.; APPEL, M. H.; MANGILI, O. C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**, 44: 693–709, 2004.

de ANDRADE, R. M. G.; de OLIVEIRA, K. C.; GIUSTI, A. L.; DIAS da SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**, 37(4):627-32, 1999.

de ANDRADE, S. A., PEDROSA, M. F *et al.* Conformational changes of *Loxosceles* venom sphingomyelinases monitored by circular dichroism. **Biochem Biophys Res Commun**, 327(1): 117-123, 2005.

de OLIVEIRA, K. C; de ANDRADE, R. M. G.; PIAZZA, R. M; FERREIRA, J. M. JR.; VAN DEN BERG, C. W.; TAMBOURGI, D. V. Variations in *Loxosceles* spider venom composition and toxicity contribute to the severity of envenomation. **Toxicon**, 45(4):421-9, 2005.

DIAS-LOPES, D.; FELICORI, L.; GUIMARÃES, G.; GOMES, E. R. M.; ROMAN-CAMPOS, D.; DUARTE, H.; DAMASCENO, D.; MARTINS, M.; KALAPOTHAKIS, E.; ALMEIDA, A. P.; GRANIER, C.; CRUZ, J. S.; GUATIMOSIM, S.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Cardiotoxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom and the recombinant venom toxin rLiD1. **Toxicon**, 56: 1426–1435, 2010.

EBASHI, S.; ENDO, M.; OHTSUKI, I. Control of muscle contraction. **Q. Rev. Biophys.**, 2: 351–384, 1969.

ENDO, M. Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. **Physiol Rev.**, 89: 1154-1176, 2009.

EYSTER, K. M. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. **Adv Physiol Educ.**, 31: 5–16, 2007.

FAGERLUND, M. J.; ERIKSSON, L. I. Current concepts in neuromuscular transmission. **British Journal of Anaesthesia**, 103 (1): 108–114, 2009.

FARAH, C. S., REINACH, F. C. The troponin complex and regulation of muscle contraction. **FASEBJ**, 9: 755-767, 1995.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W. *et al.* Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in Brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, 36, 1998.

FERREIRA, L. F.; MOYLAN, J. S.; GILLIAM, L. A. A.; SMITH, J. D.; NIKOLOVA-KARAKASHIAN, M.; REID, M. B. Sphingomyelinase stimulates oxidant signaling to

weaken skeletal muscle and promote fatigue. **Am J Physiol Cell Physiol.**, 299:C552-C560, 2010.

FERREIRA, L. F.; MOYLAN, J. S.; SHAWN, S.; SMITH, J. D.; CAMPBELL, K. S.; REID, M. B. Sphingomyelinase depresses force and calcium sensitivity of the contractile apparatus in mouse diaphragm muscle fibers. **J Appl Physiol.**, 112 (9): 1538-1545, 2012.

FIGUEIREDO, S. G., DE LIMA, M. E., CORDEIRO, M. N., DINIZ, C. R., PATTEN, D., HALLIWELL, R. F., GILROY, J., RICHARDSON, M. Purification and amino acid sequence of a highly insecticidal toxin from the venom of the Brazilian spider *Phoneutria nigriventer* which inhibits NMDA-evoked currents in rat hippocampal neurons. **Toxicon**, 39: 309-317, 2001.

FITTS, R. H. Fatigue mechanisms determining exercise performance - The cross-bridge cycle and skeletal muscle fatigue. **J Appl Physiol.**, (104): 551–558, 2008.

FITTS, R. H.; MCDONALD, K. S.; SCHLUTER, J. M. The determinants of skeletal muscle force and power: their adaptability with changes in activity pattern. **J Biomech.**, 24(1):111-22, 1991.

FLINK, M. T.; ATCHISON, W. D. Iberitoxin-induced block of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels induces dihydropyridine sensitivity of ACh release from mammalian motor nerve terminals. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 305:646–652, 2003.

FRANZINI-ARMSTRONG, C. The sarcoplasmic reticulum and the control of muscle contraction. **FASEB J.**, 13 (Suppl.): 266-270, 1999.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **Am. J. Med. Sci.** 304(4): 261-267, 1992.

GEEVES, M. A.; CONIBEAR, P. B. The role of three-state docking of myosin si with actin in force generation. **Biophysical Journal**, 68:194-201, 1995.

GILCHRIST, J. S. C.; WANG, K. K. W.; KATZ, S.; BELCASTRO, A. N. Calcium-activated neutral protease effects upon skeletal muscle sarcoplasmic reticulum protein structure and calcium release. **Journal of Biological Chemistry**, 267: 20857-20865, 1992.

GIOVANNINI, F.; SHER, E.; WEBSTER, R.; BOOT, J.; LANG, B. Calcium channel subtypes contributing to acetylcholine release from normal, 4-aminopyridine-treated and myasthenic syndrome auto-antibodies-affected neuromuscular junctions. **British Journal of Pharmacology**, 136:1135 -1145, 2002.

GHOSH, S.; STRUM, J. C.; BELL, R. M. Lipid biochemistry: functions of glycerolipids and sphingolipids in cellular signaling. **FASEB J.**, 11:45-50, 1997.

GORDON, A. M.; HOMSHER, E.; REGNIER, M. Regulation of contraction in striated muscle. **Physiological Reviews**, 80 (2): 853-923, 2000.

GREMSKI, L. H.; DA SILVEIRA, R. B.; CHAIM, O. M.; PROBST, C. M.; FERRER, V. P.; NOWATZKI, J.; WEINSCHULTZ, H. C.; MADEIRA, H. M.; GREMSKI, W.; NADER, H. B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Mol. Biosyst**, 6: 2403-2416, 2010.

GREMSKI, L. H.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V. P.; MATSUBARA, F. H.; MEISSNER, G. O.; WILLE, A. C. *et al.* Recent advances in the understanding of brown spider venoms: from the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins. **Toxicon**, 83: 91-120, 2014.

GUYTON, A. C., HALL, J. E., **Textbook of medical physiology**, 11th ed., Elsevier, E-book, 2006.

HANSON, E. J.; LOWY, J. The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle. **J. Mol. Biol.**, 6, 48–60, 1963.

HERZIG, V.; HODGSON, W. C.; ROWAN, E. G. TTX, cations and spider venom modify avian muscle tone *in vitro*. **J Venom Res.**, 2011.

HUANG, M. Z., GOPALAKRISHNAKONE, P. Pathological changes induced by an acidic phospholipase A, from *Ophiophagus hannah* venom on heart and skeletal muscle of mice after systemic injection. **Toxicon**, 34: 201-211, 1996.

HUXLEY, H. E. Fifty years of muscle and the sliding filament hypothesis. **Eur. J. Biochem.**, 271: 1403–1415, 2004.



INESI, G.; TADINI-BUONINSEGNI, F.  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  exchange, luminal  $\text{Ca}^{2+}$  release and  $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$  coupling ratios in the sarcoplasmic reticulum ATPase. **J. Cell Commun. Signal.**, 8:5–11, 2014.

JIAO, G., HAO, L.; GAO, C.; CHEN, L.; SUN, X. F.; YANG, H. L.; LI Y, DAI, Y. N.; Reduced DHPR $\alpha$ 1S and RyR1 expression levels are associated with diaphragm contractile dysfunction during sepsis. **Muscle Nerve**, 48(5):745-51, 2013.

KALAPOTHAKIS, E.; CHATZAKI, M., *et al.* The Loxtox protein family in *Loxosceles intermedia* venom. **Toxicon**, 50: 938-946, 2007.

KUSMA, J.; CHAIM, O. M.; WILLE, A. C .M.; FERRER, V. P.; SADE, Y. B.; DONATTI, L.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Nephrotoxicity caused by brown spider venom phospholipase-D (dermonecrotic toxin) depends on catalytic activity. **Biochimic.**, 90: 1722-1736, 2008.

LAJOIE, D. M.; ZOBEL-THROPP, P. A.; KUMIROV, V. K.; BANDARIAN, V.; BINFORD, G. J. *et al.* Phospholipase D toxins of brown spider venom convert lysophosphatidylcholine and sphingomyelin to cyclic phosphates. **PLOS ONE**, 8(8): e72372, 2013.

LAMB, G. D.; JUNAKAR, P. R.; STEPHENSON, D. G. Abolition of excitation-contraction coupling in skeletal muscle by raised intracellular  $[\text{Ca}^{2+}]$ . **Proceedings of the Australian Physiological and Pharmacological Society**, 25: 76, 1994.

LAMBOLEY, C. R.; MURPHY, R. M.; MCKENNA, M. J.; LAMB, G. D. Sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and leak properties, and SERCA isoform expression, in type I and type II fibers of human skeletal muscle. **J Physiol.**, 15: 592(6):1381-95, 2014.

LAVER, R. D. Coupled calcium release channels and their regulation by luminal and cytosolic ions. **Eur Biophys J.**, 34: 359-368, 2005.

LLINÁS, R.; STEINBERG, I. Z.; WALTON, K. Relationship between presynaptic calcium current and postsynaptic potential in squid giant synapse. **Biophys. J. and Biophysical Society**, 33: 323-352, 1981.

MAFRA, R. A., FIGUEIREDO, S. G., DINIZ, C. R., CORDEIRO, M. N., CRUZ, J. D. S., DE LIMA, M. E. PhTx-4 a new class of toxins from *Phoneutria nigriventer* spider

venom inhibits the glutamate uptake in rat brain synaptosomes. **Brain Res.**, 831: 297-300, 1999.

MARTIN, R.; ROSENBERG, P. Fine structural alterations associated with venom action on squid giant nerve fibers. **Journal of Cell Biology**, 36, 1968.

MEIR, A.; GINSBURG, S.; BUTKEVICH, A.; KACHALSKY, S. G.; KAISERMAN, I.; AHDUT, R.; DEMIRGOREN, S.; RAHAMIMOFF, R. Ion channels in presynaptic nerve terminals and control of transmitter release. **Physiological Reviews**, 79, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dados: Acidentes com animais peçonhentos**. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id\\_area=1498&CO\\_NOTICIA=11570](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=1498&CO_NOTICIA=11570)>. Acesso em 17 de abril de 2013.

MOSS, R. L. Effects on shortening velocity of rabbit skeletal muscle due to variations in the level of thin-filament activation. **J. Physiol.**, 377: 487–505, 1986.

NIKOLOVA-KARAKASHIAN, M. N.; REID, M. B. Sphingolipid metabolism, oxidant signaling, and contractile function of skeletal muscle. **Antioxidants & Redox Signaling**, 15(9): 2501-2517, 2011.

OLIVEIRA, B. M.; MILJANICH, G. P.; RAMACHANDRAN, J.; ADAMS, M. E. Calcium channel diversity and neurotransmitter release. **Annu. Rev. Biochem.**, 63: 823-867, 1994.

OSBORNE, R. H., Insect neurotransmission: Neurotransmitters and their receptors. **Pharmacol. Ther.**, 69: 117–142, 1996.

OSPEDAL, K. Z., APPEL, M. H., FILLUS-NETO, J., MANGILI, O. C., VEIGA, S. S., GREMSKI, W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Int. J. Exp. Path.**, 84: 287-294, 2002.

PARDO, N. E.; HAJELA, R. K.; ATCHISON, W. D. Acetylcholine release at neuromuscular junctions of adult tottering mice is controlled by N- (Cav2.2) and R-type (Cav2.3) but not L-type (Cav1.2)  $\text{Ca}^{2+}$  channels. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 319:1009–1020, 2006.

PAULI, I.; MINOZZO, J. C.; DA SILVA, P. H.; CHAIM, O. M.; VEIGA, S. S. Analysis of therapeutic benefits of antivenin at different time intervals after experimental envenomation in rabbits by venom of the brownspider (*Loxosceles intermedia*). **Toxicon**, 53: 660–671, 2009.

PEIXOTO, J. V. C. **Estudo dos efeitos da toxina recombinante da aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*) (LiRecDt1) na produção de força e no processo de acoplamento excitação-contração de músculo cardíaco e liso de rato**. 75f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

PERIASAMY, M.; KALYANASUNDARAM, A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. **Muscle Nerve**, 35(4):430-42, 2007.

PROTASI, F.; TAKEKURA, H.; WANG, Y.; CHEN, W. S. R.; MEISSNER, G.; ALLEN, P. D.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. RYR1 and RYR3 have different roles in the assembly of calcium release units of skeletal muscle. **Biophysical Journal**, 79: 2494–2508, 2000.

PUMPLIN, D. W.; REESE, T. S. Action of brown widow spider venom and botulinum toxin on the frog neuromuscular junction examined with the freeze-fracture technique. **J. Physiol.**, 273: 443-457, 1977.

RASH, L. D.; HODGSON, W. C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon**, 40: 225-254, 2002.

REYES-LUGO, M.; SÁNCHEZ, T.; FINOL, H. J.; SÁNCHEZ, E. E.; SUÁREZ, J. A.; GUERRERO, B.; RODRÍGUEZ, A. C. Neurotoxic activity and ultrastructural changes in muscles caused by the brown widow spider *Latrodectus geometricus* venom. **Rev. Inst. Med. Trop.**, 51(2): 95-101, 2009.

REZENDE, JR. L.; CORDEIRO, M. N.; OLIVEIRA, E. B.; DINIZ, C. R. Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the “armed” spider *Phoneutria nigriventer*. **Toxicon**, 29: 1225- 1233, 1991.

RHOADES, R. A.; TANNER, G. A. **Fisiologia Médica**, 2º. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

ROBERTS, M. F. Phospholipases: structural and functional motifs for working at an interface. **FASEB J.**, 10(10): 1159-1172, 1996.

ROSSETTO, O.; RIGONI, M.; MONTECUCCO, C. Different mechanism of blockade of neuroexocytosis by presynaptic neurotoxins. **Toxicology Letters**, 149: 91–101, 2004.

SAMS, H. H.; DUNNICK, C. A.; SMITH, M. L.; KING, L. E. Necrotic arachnidism. **J. Am. Acad. Dermatol.**, 44: 561–573, 2001.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: Gene regulation and functional significance. **Physiological Reviews**, 76: 371-423, 1996.

SENFF-RIBEIRO, A.; da SILVA, P. H.; CHAIM, O. M.; GREMSKI, L. H.; PALUDO, K. S.; da SILVEIRA, R. B.; GREMSKI, W.; MANGILI, O. C.; VEIGA, S. S. Biotechnological applications of brown spider (*Loxosceles genus*) venom toxins. **Biotechnology Advances**, 26: 210–218, 2008.

SESA/DEVA/DVVZI/SINAN. Dados sobre os acidentes com animais peçonhentos no estado do Paraná. Curitiba: Centro de Saúde Ambiental/ Div. Zoonoses e Animais Peçonhentos, SESA – PR. “**Boletim Epidemiológico da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná**”, 2012.

SESA/DEVA/DVVZI/SINAN. **Dados: Acidentes com animais peçonhentos.** Disponível em <http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=357>. Acesso em abril de 2014.

SPERELAKIS, N. **Cell physiology source book**. Academic Press, INC, 1995.

SQUIRE, J. M.; MORRIS, E. P. A new look at thin filament regulation in vertebrate skeletal muscle. **The FASEB Journal**, 12: 761-771, 1998.

TAVARES, F. L.; PEICHOTO, M. E. *et al.* *Loxosceles gaucho* spider venom and its sphingomyelinase fraction trigger the main functions of human and rabbit platelets. **Hum. Exp. Toxicol**, 2011.

TSKHOVREBOVA, L.; TRINICK, J. Roles of titin in the structure and elasticity of the sarcomere. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2010.

TUPLING, A. R.; ASAH, M.; MACLENNAN, D. H. Sarcolipin overexpression in rat slow twitch muscle inhibits sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and impairs

contractile function. **The Journal of Biological Chemistry**, 277(47): 44740–44746, 2002.

ULLAH, A.; DE GIUSEPPE, P. O.; MURAKAMI, M. T. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a class II Phospholipase D from *Loxosceles intermedia* venom. **Acta Cryst.**, F67, 234–236, 2011.

VINOGRADOVA, M. V.; STONE, D. B.; MALANINA, G. G.; KARATZAFERI, C.; COOKE, R.; MENDELSON, R. A.; FLETTERICK, R. J.  $\text{Ca}^{2+}$ - regulated structural changes in troponin. **PNAS**, 102(14): 5038-5043, 2005.

WESTENDORF, J. **Natural Compounds**. Department of Toxicology, Hamburg, Germany 40: 959-1007, 1998.

WILLE, A. C. M.; CHAVES-MOREIRA, D.; TREVISAN-SILVA, D.; MAGNONI, M. G.; BOIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; CHAIM, O. M.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S. S., Modulation of membrane phospholipids, the cytosolic calcium influx and cell proliferation following treatment of B16-F10 cells with recombinant phospholipase-D from *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**, 67: 17–30, 2013.

ZALK, R.; LEHNART, S. E.; MARKS, A. R. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. **Annu. Rev. Biochem.**, 76: 367-85, 2007.